

TARTU ÜLIKOOL

LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

TEHNOLOOGIAINSTITUUT

Marin Sulomägi

**Valgusünteesi inhibeerivate antibiootikumide mõju ribosoomide stabiilsusele
soolekepikeses *Escherichia coli***

Bakalaureusetöö

Juhendaja PhD Ülo Maiväli

TARTU 2013

SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID	4
SISSEJUHATUS	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	6
1.1 Ribosoom	6
1.2 Ribosomaalsete komponentide süntees ning selle regulatsioon.....	6
1.2.1 Ribosomaalne RNA (rRNA)	6
1.2.2 Ribosomaalse RNA süntees	7
1.2.3 Maturatsioon.....	8
1.2.4 Ribosomaalsed valgud.....	9
1.2.5 Ribosomaalsete valkude süntees ja selle regulatsioon	10
1.3 Ribosoomi subühikute kokkupanek	11
1.3.1 30S subühiku assembleerumine	11
1.3.2 50S subühiku assembleerumine	12
1.4 Ribosoomide funktsioon	13
1.4.1 Translatsioon	13
1.4.2. Matriits-mRNA ehk mRNA	14
1.4.3 Transport-RNA ehk tRNA	14
1.4.4 Translatsiooni initsiatsioon	15
1.4.5 Translatsiooni elongatsioon.....	15
1.4.6 Translatsiooni terminatsioon	16
1.5 Ribosoomide degradatsioon	17
1.5.1 Ribosoomide lagunemise põhjused	17
1.5.2 Nälg	18
1.5.3 Kasvufaas	18
1.5.4 Antibiootikumid ja ribosoomide lagundamine	19
1.5.5 Ensüümid, mis osalevad rRNA lagundamisel	20
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	21
2.1 Töö eesmärgid	21
2.2 Materjalid ja meetodid	21
2.2.1 Kasutatud tüved ja konstruktid	21
2.2.2 Northern blot	22
2.2.3 Rakkude kasvatamine.....	22
2.2.4 RNA puhastamine rakkudest.....	22

2.2.5 Proovide ettevalmistamine	23
2.2.6 Geeli valmistamine.....	23
2.2.7 Ülekanne geelilt membraanile.....	24
2.2.8 Hübridisatsioon	24
2.2.9 Membraani pesemine	24
2.2.10 Blokeerimine ja antikeha detektsioon	24
2.2.11 Oligo mahapesemine filtrilt.....	24
2.3 Korrektelt assambleeritud ribosoomide stabiilsus antibiootikumide juuresolekul	25
2.3.1 pBAD promootori aktivatsioon/inhibitatsioon	25
2.3.2 Rakkude märkimine $[H]^3$ uridiiniga	25
2.3.3 RNA puhastamine rakulüsaadist	25
2.3.4 16S rRNA eraldamine	25
2.3.5 23S rRNA eraldamine	26
2.4 Minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni määramine	26
2.4.1 Rakkude lahjenduste valmistamine	26
2.4.2 Antibiootikumide lahjenduste valmistamine.....	26
2.5 Tulemused	27
2.5.1 Ribosomaalse RNA fragmenteerimise määramine Northern blot meetodiga	27
2.5.2 Korrektelt assambleeritud ribosoomide stabiilsus antibiootikumide juuresolekul	29
2.5.3 Antibiootikumide minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni määramine	31
2.6 Arutelu.....	34
KOKKUVÕTE	35
SUMMARY	37
KIRJANDUSE LOETELU.....	39
LISA 1	44
LISA 2	48
Lihtlitsents	50

KASUTATUD LÜHENDID

aa-tRNA - aminoatsüül-tRNA

AB - antibiootikum

AH - aminohape

aSD - anti Shine-Dalgarno

EF(-Tu, -G) - elongatsiooni faktor (-Tu, -G)

E.coli - *Escherichia coli*

IF (1,2,3) - initsiatsoonifaktor (1,2,3)

fMet-tRNA^{fMet} - formüülmetionüül tRNA

mRNA - matriits-RNA

mQ - milli Q

nm - nanomeeter

RF - vabastajafaktor (release factor)

RNA – ribonukleinhape

RNAas - ribonukleaas

RNAP - RNA polümeraas

rRNA - ribosomaalne RNA

r-valk - ribosomaalne valk

SD - Shine-Dalgarno

SDS - naatriumdodetsüülsulfaat

tRNA - transport RNA

SISSEJUHATUS

Kahest subühikust koosnev ribosoom vastutab valgusünteesi eest. Ribosoom ise koosneb rRNA-st ja ribosomaalsetest valkudest. Nende komponentide süntees toimub stöhhiomeetriliselt. Ribosoomide kokkupanek on keerukas protsess, koosnedes paljudest erinevatest etappidest. Lisaks komponentide sünteesile on oluline, et nii rRNA kui ka ribosomaalsed valgud oleks õiges konformatsioonis ja vastavalt modifitseeritud. Nii 30S kui ka 50S subühiku kokkupanek toimub läbi vaheetappide. Ribosoomi ülesandeks on varustada rakku vajaminevate valkudega. Translatsioon koosneb kolmest etapist: initsiatsioonist, elongatsioonist ja terminatsioonist. Initsiatsiooni etapiks on vaja, et 70S ribosoom lahkneks 30S ja 50S subühikuks, seejärel seondub mRNA ribosoomi väikese subühikuga. Selleks, et elongatsioon saaks alata, on vaja, et väike ja suur subühik taas ühineks. Elongatsiooni käigus toimub sünteesitava peptiidahela pikenemine. Kui mRNA-s jõutakse stoppkoodonini, siis on see märguandeks terminatsioonile. Selle käigus vabaneb ribosoomist valmis peptiidahel ning ribosoomi subühikud dissotsieeruvad. Tsükkel hakkab otsast peale. Iga etappi katalüüsivad spetsiifilised valgulised faktorid, mis on vajalikud translatsiooni korrektseks toimumiseks.

Kiiresti kasvavates rakkudes on ka rohkem ribosoomi, mis varustavad rakku vajaminevate valkudega. Ribosoomide arv võib väheneda keskkonnatingimuste muutumisel. Näiteks näljatingimustes või statsionaarses faasis, kus toitaineid on vähem, toimub ribosoomide ulatuslik degradatsioon. Ka mitmsugused ained mõjutavad ribosoomide stabiilsust. Näiteks antibiootikumide toime, mis põhjustavad defekte ribosoomide assembleerumisel, võivad valesti kokkupandid ribosoomid muutuda substraadiks ribonukleasidele. Ribonukleaaase, mis osalevad stabiilse rRNA lagundamisel, on palju ja tihti on neil ka kattuvad funktsioonid.

Käesoleva töö eesmärgiks on uurida, kas valgusünteesi inhibeerivad antibiootikumid põhjustavad ribosoomide lagundamist.

Täna oma juhendajat Ülo Maivälja igakülgse abi ja nõu eest.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Ribosoom

Ribosoom on tsütoplasmaatiline nukleoproteiin-osake, mille funktsiooniks on mRNA (matriits-RNA) dekodeerimine valguks. Ribosoomi moodustumine on keerukas protsess, see hõlmab nii sünteesi, protsessimist ehk töötlemist, rRNA (ribosomaalne RNA) ning r-valkude (ribosomaalsed valgud) modifitseerimist kui ka ribosoomi komponentide kokkupanekut ehk assembleerimist. Ribosoomi, mis koosneb kahest subühikust (rRNA+valgud), molekulimass on umbes 2,5 kDa. Ribosoom koosneb 2/3 RNA-st ja 1/3 valkudest. (Kaczanowska ja Ryde'n-Aulin, 2007). 30S ja 50S subühikute ühinedes moodustub bakteris 70S ribosoom (erinevalt eukarüootides esinevast 80S ribosoomist, mis moodustub 40S ja 60S subühikutest). Prokarüootse ribosoomi 30S subühik koosneb 16S rRNA molekulist ning sellega seondunud 21-st erinevast valgust (S1-S21). Väikeses subühikus asub dekodeerimistsenter, kus toimub koodon-antikoodon interaktsioon. Suurem subühik koosneb 2-st RNA molekulist, milleks on 23S rRNA ja 5S rRNA ning 33-st valgust. 50S subühikus paikneb peptidüültransferaasi tseenter, mis vastutab peptiidsideme moodustamise eest kasvavas valguahelas.

Raku kasv ning translatsiooniline aktiivsus on otseses seoses. Kuna ribosoom on üsna keeruka ehitusega kompleks, siis selle tootmine on energeetiliselt kulukas. Vastavalt sellele sõltub ribosoomide arv raku vajadustest (Wagner, 2002; Maiväli *et al.*, 2013). Ribosoomi normaalse funktsioneerimise jaoks on oluline vastavate subühikute ja valkude koordineeritud biosüntees ning nende õige kokkupanek.

RNA molekulid on olulisel kohal ribosoomide funktsioneerimisel. Lisaks rRNA-le on korrektse valgusünteesi toimumiseks vajalikud ka mRNA (matriits-RNA) ja tRNA (transport-RNA)

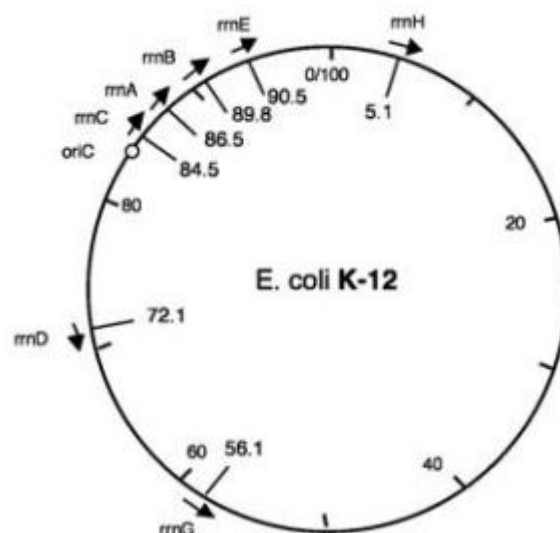
1.2 Ribosomaalsete komponentide süntees ning selle regulatsioon

Ribosoomide sünteesi regulatsioon on oluliseks uurimisobjektiks juba üle 50 aasta (Schneider *et al.*, 2003). Ribosoomide assembleerumine algab ribosomaalsete komponentide sünteesiga. Nendeks on rRNA ja valgud. 16S, 23S ja 5S sünteesitakse algselt ühe primaarse transkriptina. rRNA protsessimine, modifitseerimine ning kokkupanek algab kotranskriptsiooniliselt.

1.2.1 Ribosomaalne RNA (rRNA)

rRNA süntees on limiteerivaks etapiks ribosoomide biosünteesil. Prokarüootses ribosoomis leidub 3 erinevat rRNA molekuli: 5S rRNA, 23S rRNA ja 16S rRNA. Enamikes eubakterites on rRNA geenid koondunud operonidesse. *E.coli*'l (*Escherichia coli*) on 7 operoni (rrnA, rrnB,

rrnC, rrnD, rrnE, rrnG, rrnH) (joonis 1), mis on sarnase struktuuriga ning sisaldavad kolme ribosomaalse RNA geene. 16S rRNA asub operoni 5'-otsa lähedal, sellele järgneb 23S rRNA ning 3'-otsa lähedal asub 5S rRNA (Deutscher, 2009). Algselt transkribeeritakse üks primaarne transkript. Igal operoni transkriptsioon toimub 2-lt promootorilt: rrn P1 ja rrn P2. Nende kahe promootori vahel on umbes 20 aluspaari. *E.coli* P1 ja P2 on ühed tugevamatest teadaolevatest promootoritest. Leitud on, et P1 promootor on tugevam kui P2. P1 on aktiivsem soodsates kasvutingimustes ning P2 panustab rohkem aeglase kasvukiiruse korral (Paul *et.al.*, 2004). Transkripti maturatsioon toimub lokaalsete sekundaarstruktuuride kaudu ning ribosomaalsete valkude seondumine algab enne, kui transkriptsioon on lõppenud. Samaaegselt toimub rRNA keemiline modifitseerimine ning lõikamine erinevate RNAaside (ribonukleaaside) poolt valmisproduktiks. Ribosomaalse RNA promootorid on sihtmärgiks paljudele reguleerivate mehhanismidele. On näidatud, et *E.coli* osade operonide inaktiveerumisel tõusis alles jäänud koopiate aktiivsus. See viitab sellele, et tavatingimustes ei tööta operonid täisefektiivsusega (Condon *et al.*, 1993).



Joonis 1. *E.coli* rRNA geenide genoomne organisatsioon. Seitsme rRNA operoni paigutus on antud minutites ning nooled kujutavad transkriptsiooni kulgemise suunda (Hillebrand *et al.*, 2005)

1.2.2 Ribosomaalse RNA süntees

E.coli’l on 2 promootorit: P1 ja P2, mis osalevad rRNA sünteesil, lisaks sellele on vajalikud ka -10 ja -35 ning UP elemendid ja FIS valk. P1 promootor sisaldab A+T rikast järjestust, mida nimetatakse UP-elementiks (Schneider *et al.*, 2003). UP-elementi ülesandeks on interakteeruda RNAP (RNA polümeraasi) alfa-subühiku C-terminusega ja tänu sellele suureneb transkriptsiooni aktiivsus märgatavalt. Lisaks kasvab transkriptsiooniline aktiivsus kolm kuni kaheksa korda tänu FIS valgu seondumisele, mis soodustab RNAP seondumist.

H-NS seondumine aga seevastu inhibeerib transkriptsiooni. rrnP2 promootori roll rRNA geenide transkriptsioonil pole päris hästi teada. Üsna hiljuti avastati, et vastavat promootorit mõjutavad enam-vähem samad efektorid, kuid nende poolt indutseeritud muudatused pole nii laiaulatuslikud kui rrnP1 puhul. rRNA sünteesi regulatsioonil on olulisel kohal järgmised efektormolekuliid: FIS, H-NS, ppGpp ja NTP (Paul *et al.*, 2004).

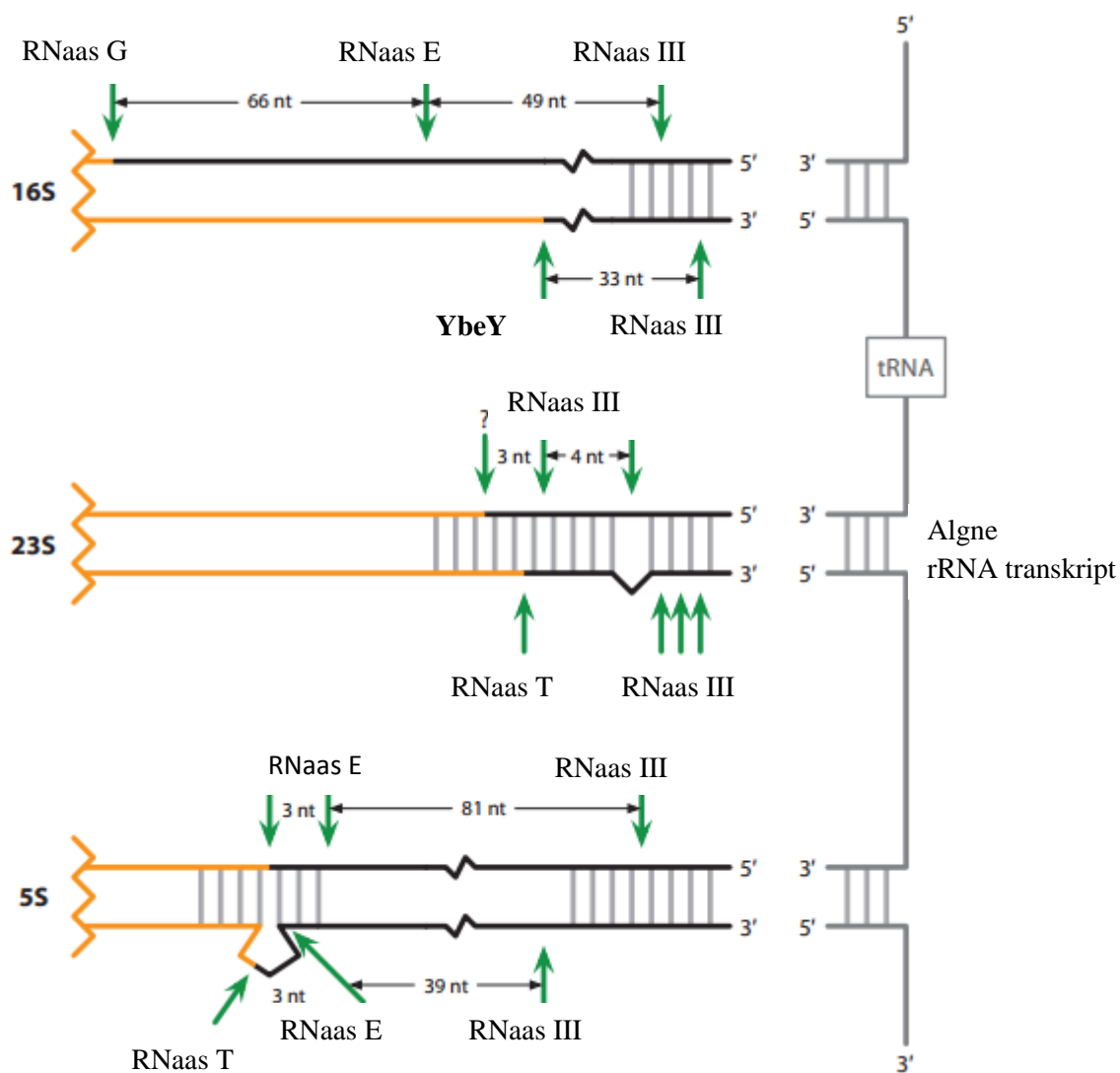
- rrnP1 kõrge aktiivsuse tagavad FIS-seondumissaidid ja UP elemendid. UP elemendid panustavad rrnP1 aktiivsusesse kõige rohkem, suurendades seda 20-50 korda. Erinevalt FIS valgust, mis suurendab transkriptsiooni, H-NS inhibeerib rrnP1 aktiivsust.
- rrnP2 promootorist allavoolu asub BoxA element, mis takistab transkriptide enneaegset terminatsiooni.

FIS kontsentratsioon on väga madal aeglasel kasvukiirusel ja statsionaarses faasis ning H-NS hulk väheneb statsionaarses faasis. Valkude hulga muutused kajastavad muudatusi kasvutingimustes ning tagavad normaalse rRNA geenide ekspressiooni. Kiiremini kasvavates rakkudes on rrnP1 promootorid aktiivsemad kui rrnP2 ning vastavalt sellele panustavad need promootorid rRNA transkriptsiooni rohkem. Statsionaarses faasis, aga rrnP1 aktiivsus langeb ning siis panustab rRNA sünteesi rrnP2 promootor rohkem kui rrnP1. Vastavate promootorite aktiivsuste muutumine tagab selle, et RNA transkriptsioon vastab raku vajadustele erinevates keskkonnatingimustes (Nierhaus ja Wilson, 2004).

1.2.3 Maturatsioon

rRNA-de töötlemisel võib eristada kahte etappi: lõikamine ja sellele järgnev modifitseerimine. Lõikamist viivad läbi endonukleasid. RNAas III ehk ribonukleas III on esimene endoribonukleas, mis lõikab primaarset transkripti ning selle tulemusena moodustuvad 16S rRNA (17S rRNA), 23S rRNA ja 5S rRNA (17S rRNA) prekursorid (Nierhaus ja Wilson, 2004). RNAas III puudumisel võib 16S rRNA ja 23S rRNA separatsiooni läbi viia mõni teine endonukleas, kuid vajalik on ka teiste ribonukleasid aktiivsus selleks, et saada osaliselt või täielikult valmis produktid (Deutscher, 2009). Sõltuvalt operonist võivad lõikamise tulemusena moodustuda ka mõned tRNA prekursorid. rRNA ja tRNA prekursorite lõpliku töötlemist viivad läbi eksonukleasid, mis eemaldavad molekulide otstest üleliigsed nukleotiidiid (Nierhaus ja Wilson, 2004). 16S rRNA prekursori 5'-otsas olevad 115 nukleotiidiid ja 3'-otsas olevad 33 nukleotiidiid eemaldavad RNAas E, RNAas G ja YbeY (Maiväli *et al.*, 2013). 23S rRNA prekursor sisaldab 5'-otsas 3 või 7 lisanukleotiidiid ning 3'-otsas 7 või 9 lisanukleotiidiid, mis pärast RNAas III poolt läbiviidud lõikust töödeldakse RNAas T poolt. 5S

rRNA prekursor sisaldab 5'-otsas 84 lisanukleotiidi ja 3'-otsas 42 lisanukleotiidi, mille lõikamine toimub RNAas E abil, mis jätab igasse otsa 3 nukleotiidi. Lõplik maturatsioon viiakse läbi RNAas T ja ühe tundmatu RNAasi poolt (Kaczanowska ja Ryde'n-Aulin, 2007). Tavaliselt modifitseeritakse konserveerunud ning funktsionaalselt olulisi nukleotiide. Modifikatsioonid on olulised nii ribosoomi õige struktuuri kui ka funktsioneerimise jaoks. Praeguseks ajaks on teada, et 16S rRNA-ga toimub 11 ja 23S rRNA-ga toimub 25 modifikatsiooni (Shajani *et al.*, 2011).



Joonis 2. rRNA maturatsioon. 16S, 23S ja 5S rRNA saadakse algselt ühe transkriptina, mida töödeldakse edasi erinevate RNAasidega. Küsimärgid viitavad tundamatutele ensüümidele (Shajani *et al.*, 2011). Modifitseeritud: YbeY (Maiväli *et al.*, 2013).

1.2.4 Ribosomaalsed valgud

E. coli ribosoom sisaldab 54 valku, 34 valku 50S subühiku ja 21 valku 30S subühiku koosseisus (Zengel ja Lindahl, 1994). Erinevalt rRNA geenidest, mida leidub mitu koopiat, esinevad enamik ribosomaalsete valkude geenid ainult ühe koopiana. Ribosomaalsed valgud

jagunevad kahte gruppi: ühed, mis seonduvad 50S subühikuga, ja teised, mis seonduvad 30S subühikuga. Ribosoomi väikese subühikuga seonduvaid valke nimetatakse S- Valkudeks (väikesed valgud, inglise keeles small) ning ja suure subühikuga seonduvaid valke nimetatakse L- Valkudeks (suured valgud, inglise keeles large).

1.2.5 Ribosomaalsete valkude süntees ja selle regulatsioon

Üle poolte ribosomaalsete valkude geenidest on koondunud *spc*, *S10*, *str* ja α -operonidesse. Ülejäänud geenid paiknevad hajusalt üle kogu genoomi ja moodustavad 1-4 ribosomaalsete valkude geenidest koosneid operone. Bakteriaalne mRNA on reeglina polütsistronne ehk üks mRNA kodeerib mitut valku. Ribosomaalsete valkude ekspressioon on korreleeritud rRNA hulgaga rakus. Juhul kui rRNA ja r-proteiinide stöhhiomeetria läheb paigast ära ning vastavaid valke toodetakse ülehulgas, siis r-Valkude kuhjumine reguleerib negatiivse tagasiside kaudu r-Valkude ekspressiooni (Nierhaus ja Wilson, 2004).

- **spc operon:** regulatoorse valgu *S8* seondumissait asub kolmanda geeni (*L5*) ees. Nii takistab see otseselt *L5* ning sellest allavoolu paiknevate geenide translatsiooni (Mattheakis *et al.*, 1989). *S8* repressseerib *L14* ja *L24* kaudselt ning selle tulemusena vabanevad ribosoomid mRNA-lt. Nii muutub mRNA sihtmärgiks endonukleasidele, mis eemaldavad *L14* ja *L24* tsistronid (Nierhaus ja Wilson, 2004).
- **S10 operon:** see operon kodeerib 11 r-Valku ja nende ekspressiooni regulatsiooni transkriptsiooni ja ekspressiooni tasemel kontrollib *L4* (Zengel ja Lindahl, 1990). Regulatoorsed elemendid asuvad 172 nukleotiidi hulgas 5'-otsas. Transkriptsiooni regulatsioonil osalevad helikaasid *HD* ja *HE* ning translatsioonil *HE* ja allavoolu paiknev järjestus (Nierhaus ja Wilson, 2004).
- **α -operon** kodeerib nelja valku (*S4*, *S11*, *S13* ja *L17*) ja RNA polümeraasi α -subühikut. Nende geenide ekspressiooni reguleerib *S4* (Thomas *et al.*, 1987).
- **str operon** on oma nime saanud mutatsiooni tõttu esimeses geenis, mis kodeerib *S12* valku. See mutatsioon võib põhjustada resistentsust antibiootikumi streptomütsiini vastu. Selles operonis paiknevad geenid, mis kodeerivad *S12*, *S7*, *EF-G* (elongatsioonifaktor *G*) ja üks *EF-Tu*-d kodeerivatest geenidest (*tufA*). *S7* on repressseeriva toimega ning see on võimeline inhibeerima ka *S12*-st. (Nierhaus ja Wilson, 2004).

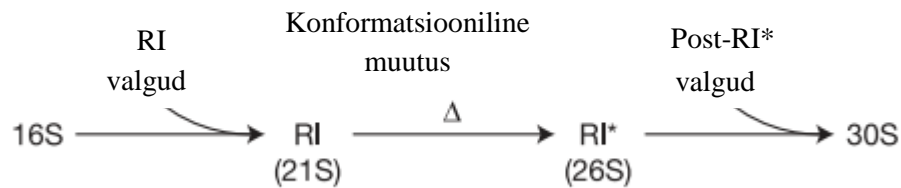
1.3 Ribosoomi subühikute kokkupanek

Ekspotentsiaalselt kasvavates *E.coli* rakkudes esineb korrelatsioon kasvukiiruse ja ribosoomide hulga vahel. Ribosoomid võivad moodustada kuni 50% prokarüootide kuivmassist. Kuna ribosoomid on raku õige funktsioneerimise seisukohalt väga olulised ning nende kokkupanek on energiakulukas, siis on oluline, et assembleerumine toimuks õigesti. Ribosoomide kokkupanek on keeruline ning kompleksne protsess, hõlmates palju erinevaid sündmusi, mis kulgevad paralleelselt. Kokkupanek toimub konformatsiooniliste muudatuste ja ribosomaalsete valkude seondumise kaudu (Shajani *et al.*, 2011). Seega on oluline, et nii rRNA kui ka ribosomaalsed valgud oleksid õigesti voltunud ja vastavalt vajadusele modifitseeritud. Ribosoomide moodustumine algab rRNA transkriptsooniga ning lõppeb 70S ribosoomi tekkega (joonis 4). Mitmed mitte-ribosomaalsed faktorid ehk ribosoomi maturatsiooni faktorid osalevad ribosoomi kokkupanekul. *E.coli*'s on sellised faktoreid ~20, pärmis ca 200.

1.3.1 30S subühiku assembleerumine

Ribosoomi väikene alaühik koosneb 21-st valgust (S1-S21) ja 16S rRNA-st (Held *et al.*, 1973) 30S subühiku ülesandeks on seonduda mRNA-ga translatsiooni initsiatsiooni käigus. Valkude seondumine rRNA-ga toimub koöperatiivselt. Ehkki puudub üks ja õige valkude seostumise järjekord, seonduvad osad valgud keskelt läbi kiiremini kui teised. (Talkington *et al.*, 2005). 30S subühik jaguneb kolmeks domääniks: keha (5' otsas), platvorm (keskel) ja pea (3' otsas). 30S subühiku kolme domääni moodustumine kulgeb üksteisest suuresti sõltumatult (Shajani *et al.*, 2011). Valgud, mis seonduvad ribosoomi väikese subühikuga, on jagatud kolme gruppi: primaarsed, sekundaarsed ja tertsiaarsed (Holmes ja Culver, 2004). Kokkupanek kulgeb 5'-3' polaarsusega (Williamson, 2008). Primaarsed valgud (S4, S7, S8, S15, S17, S20) seonduvad otse 16S rRNA-ga ning algatavad selle voltumist. Hakkavad moodustuma 30S subühiku 3 piirkonda: keha, platvorm ja pea (Culver, 2003). Sekundaarsete valkude (S5, S6, S9, S11, S12, S13, S16, S18, S19) seondumise jaoks on vaja vähemalt ühte primaarset valku. Tertsiaarsed valgud (S2, S3, S10, S14, S21) vajavad, aga korrektseks liitumiseks vähemalt ühte primaarset ja ühte sekundaarset valku. *In vitro* sooritatud katsetes on 30S moodustumiseks vaja 3 etappi. Alguses toimub 16S rRNA ja teatud valkude seondumine (0-15 °C), moodustub R1 (21S) vahekompleks, mis koosneb 16S rRNAst ja primaarsetest ja sekundaarsetest valkudest. Temperatuuri tõstmisel 42 °C-ni tekib R1* (26S). R1*-ga seonduvad tertsiaarsed valgud ning moodustub 30S subühik (joonis 3) (Holmes ja Culver, 2004). Madalamatel temperatuuridel üleminek R1-> R1* peatub ning hakkab kogunema intermediaat sedimentatsiooni koefitsendiga 21S. Seega valgud, mis seonduvad

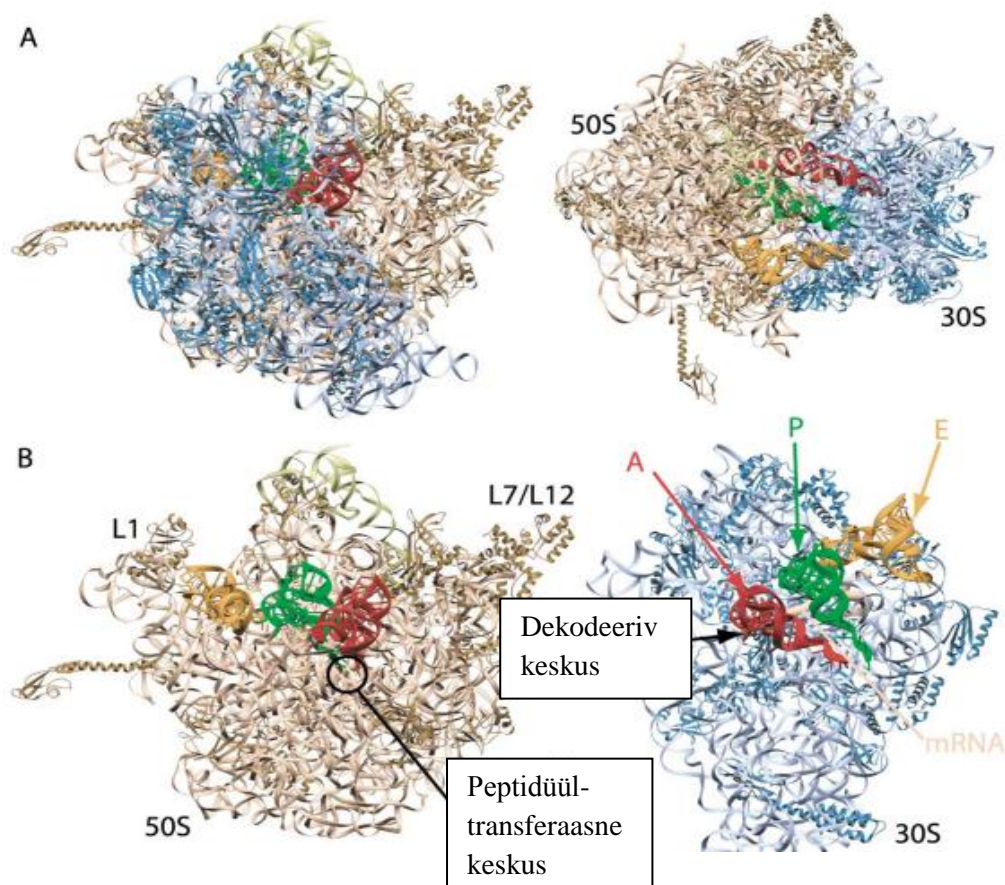
hiljem, vajavad kõrgemat temperatuuri (Talkington *et al.*, 2005). R1 üleminekul R1* on tähtsal kohal valgud S4, S5, S7, S8 ja S9 (Holmes ja Culver, 2004).



Joonis 3. 30S subühiku assembleerumine (Talkington *et al.*, 2005).

1.3.2 50S subühiku assembleerumine

Riboomi suur subühik sisaldab peptüdüültransferaasi tsentrit, mis vastutab peptiidsideme moodustumise eest. Kuigi 50S subühiku kokkupanekul leidub palju ühiseid jooni 30S subühiku moodustumisega, on suure subühiku tekkimisel osalevad protsessid märksa keerukamad. 23S rRNA on 2 korda suurem kui 16S rRNA ning temaga seondub 21 valgu asemel 33. Lisaks sellele peab 23S rRNA korrektselt seonduma 5S rRNA-ga. (Nierhaus ja Wilson, 2004). 50S subühiku moodustamisele eelneb 3 prekursori moodustumine: 33S, 41S ja 48S (Herold ja Nierhaus, 1986). 5S rRNA ja 23S rRNA vaheline seondumine toimub valkude vahendusel. Seda võivad läbi viia antud valgud: L2, L3, L4, L5, L15, L16, L18 ja L25. Seondumisel omavad tähtsamat rolli L5, L15 ja L16. L2, L3 ja L4 toetavad L15 poolt läbiviidavat seondumist (Röhl ja Nierhaus, 1982). 50S subühiku assembleerumise muudab keerukaks ka see, et kui 30S-i domäänid assembleeruvad iseseisvalt, siis 50S-i omad mitte.



Joonis 4. Ribosoomi kristallstruktuur (**A**) 70S ribosoom kompleksis mRNA ja tRNA-ga (Yusupov *et al.*, 2001), vasakul vaade pealt ja paremal vaade 30S subühiku poolt. (**B**) vaade 50S (vasakul) ja 30S (paremal) sisse, näidates A-, P-, E-saidi tRNA-d (Ramakrishnan, 2002).

1.4 Ribosoomide funktsioon

Ribosoom on tsütoplasmaatiline nukleoproteiin-osake, mille põhiliseks funktsiooniks on mRNA dekodeerimine valguks. Vastavat protsessi nimetatakse translatsiooniks. Geneetiline kood, ribosomaalne RNA ning valgud on tugevalt konserveerunud kõigis organismides. (Malys ja McCarthy, 2011). Prokarüootidel esineb 70S ribosoom, mis koosneb 30S (~1500 nukleotiidi pikk 16S rRNA + 21 valku) ja 50S subühikust (~3000-3200 nukleotiidi pikk 23S rRNA ja 5S rRNA+ 33 valku).

1.4.1 Translatsioon

Translatsiooni käigus tehakse mRNA-s peituvat informatsiooni alusel polüpeptiidi molekul (Moat *et al.*, 2002). Translatsiooni tsükkel koosneb 3 protsessist: initsiatsioonist, elongatsioonist ja terminatsioonist. Selleks, et translatsioon toimiks korrektselt on vajalik

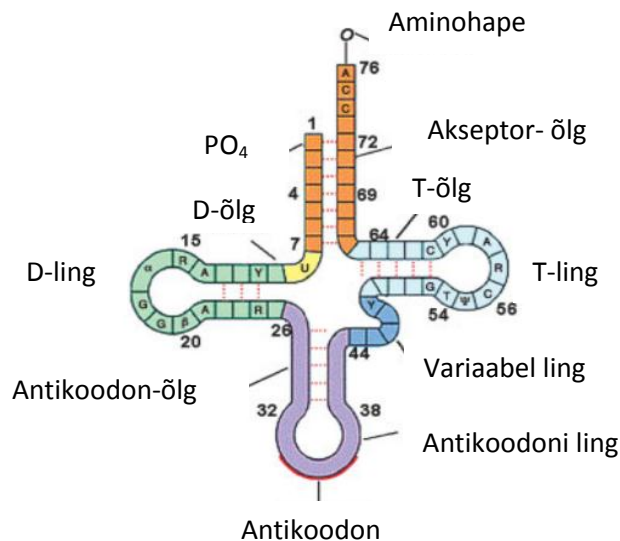
mitmete faktoride osalemine (joonis 6). Translatsiooni võtmekomponentideks on mRNA, tRNA, aa-tRNA (aminoatsüül-tRNA) ja ribosoom.

1.4.2. Matriits-mRNA ehk mRNA

mRNA kuulub rakus leitava ebastabiilse RNA hulka. Kuna erinevaid valke läheb vaja erinevatel ajahetkedel ning ka erinevates kogustes, siis vastavalt sellele varieeruvad ka erinevate mRNA pooleluead, mis on tavaliselt mõni minut. mRNA lagundamisel osalevad RNAas E ja eksosoom. Prokarüootne mRNA on polütsistronne ehk üks mRNA kodeerib mitut valku. mRNA on valgusünteesil olulisel kohal, kuna sisalab informatsiooni valgu järjestuse kohta (Moat *et al.*, 2002). mRNA valku kodeeriv ala moodustub järjestikku paiknevatest ja mittekatuvatest koodonitest, mida nimetatakse avatud lugemisraamiks (ORF). Iga ORF on spetsialiseerunud kindla valgu sünteesile ning lõppeb mRNA-s paiknevatel saitidel.

1.4.3 Transport-RNA ehk tRNA

tRNA moodustab *E. coli* rakus leitavast RNA-st 10-15%. Iga tRNA molekulimass on umbes 25 kDa ning nende pikkus on varieeruv. Tavaliselt on tRNA molekul umbes 80 nukleotiidi pikk (Nierhaus ja Wilson, 2004). Igal tRNA molekulil on koodoni, ligaasi ja ribosoomi äratundmissait ja spetsiifiline aminohappe sidumissait (Moat *et al.*, 2002). tRNA sekundaarstruktuur meenutab ristikehinalehte ning selle moodustavad 3 juuksenõelastruktuuri (T-, D- ja antikoodon-ling) ja neli helikaasi. Lisaks eksisteerib veel variaabel-ling antikoodoni- ja T-lingu vahel ning vastavalt selle pikkusele on tRNA-d jagatud klass I ja klass II vahel. tRNA-d lagundatakse nagu ribosoomi: protsessimise käigus ja rakukasvu aeglustumisel, näiteks stressitingimustel.



Joonis 5. tRNA sekundaarstruktuur (Nierhaus ja Wilson, 2004).

1.4.4 Translatsiooni initsiatsioon

Translatsiooni initsiatsioon on limiteeriv etapp valgusünteesil. (Watson *et al.*, 2004). Selles etapis seondub mRNA ribosoomiga ning fMet-tRNA ribosoomi P-saidiga. Lisaks eelnevalt nimetatud komponentidele on valgusünteesi toimumiseks vaja ka kolme initsiatsioonifaktorit: IF1, IF2, IF3 ja GTP hüdrolüüsi (Kycia *et al.*, 1995).

Kui kõik 3 faktorit on seondunud, on 30S subühik valmis siduma mRNA-d ja initsiaator tRNA (fMet-tRNA-d). Geeniekspressiooni regulatsioon translatsiooni tasemel sõltub ribosoomide võimest siduda mRNA-d. Seandumiseks mRNA-ga on tavaliselt vajalik paardumine SD-aSD vahel. Samuti võib seandumine toimuda ribosomaalsete valkude vahendusel. Ribosomaalel valgul S1 arvatakse olevat selles oluline roll (Boni *et al.*, 1990). See interaktsioon soodustab translatsiooni, kuna aitab positsioneerida AUG startkoodonit P-saidis. fMet-tRNA seandumine toimub IF2–GTP vahendusel. *E.coli*'s leidub 3 erinevat IF2 (IF α , IF β ja IF γ), mis erinevad N-terminuse poolest (Moreno *et al.*, 1999). Viimane etapp initsiatsioonil on 70S initsiatsioonikompleksi moodustumine. fMet-tRNA ja startkoodoni interaktsiooni tulemusena toimuvad väikeses subühikus konformatsioonilised muudatused, mis põhjustab IF3 vabanemist ning nii saab suur subühik seonduda väikese subühikuga. See põhjustab IF2-GTP hüdrolüüsi ning tekkinud IF2-GDP omab madalat afiinsust ribosoomi ja fMet-tRNA suhtes ning vabaneb kompleksist, vabaneb ka IF1.

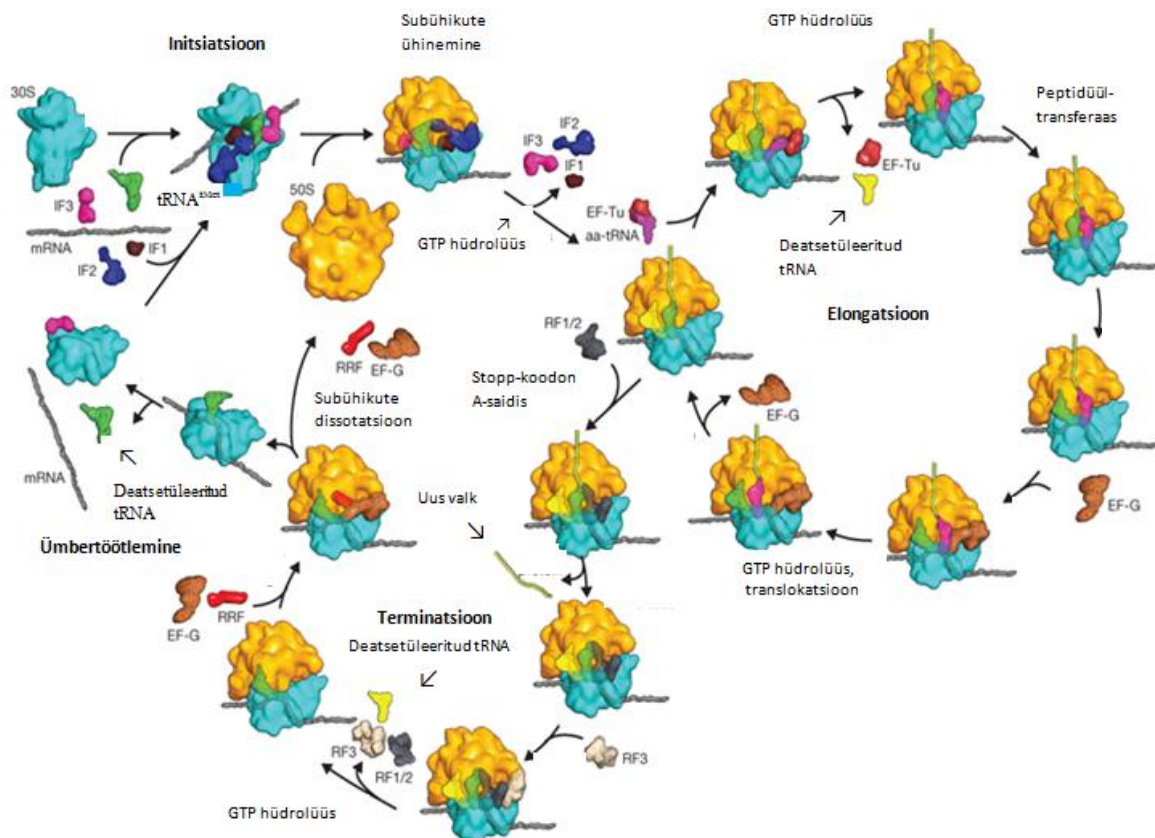
1.4.5 Translatsiooni elongatsioon

Pärast initsiatsiooni etappi tuleb elongatsioon, mille käigus toimub polüpeptiidahela pikenemine. Iga aminohappe lisandumisel on 3 põhietappi, mis on vajalikud korrektse

valgusünteesi toimumiseks. Elongatsiooni õigeks toimumiseks on vajalik ka elongatsiooni-faktorite (EF-Tu ja EF-G) osalemine. Aminoatsüül-tRNA, EF-Tu, GTP moodustavad kompleksi, mis on võimeline seonduma ribosoomiga (Stark *et al.*, 1997). See kompleks on vajalik õige aminoatsüül-tRNA viimiseks ribosoomi A-saiti, kus toimub paardumine mRNA ja tRNA vastavate koodonite ja antikoodonite vahel, toimub ka GTP hüdroolüüs. Elongatsiooni edasiseks kulgemiseks on vajalik EF-Tu:GDP kompleksi eemaldumine ribosoomist. Sellele järgneb peptiidsideme moodustumine A-saidis oleva aa-tRNA aminorühma ja P-saidis olema peptidüül-tRNA küljes oleva peptiidahela C-terminuse vahel. Reaktsiooni toimumise eest vastutab 50S subühikus olev peptidüültransferaasi tsenter, mis sisaldab 23S rRNA-st. Kolmandas etapis toimub peptidüül-tRNA ja peptiidahelast ilma jäänud tRNA liikumine A- ja P-saidist vastavalt P- ja E-saiti. Translokatsiooni viib läbi elongatsiooni faktor EF-G, mis saab energiat GTP hüdroolüüsist (Moat *et al.*, 2002).

1.4.6 Translatsiooni terminatsioon

Translatsiooni terminatsiooni signaaliks on A-saiti sisenenud stoppkoodon (UAG, UGA või UUA), mille tunnevad ära vabastaja-faktorid ehk RF-d (inglise keeles release factor). RF-d jagunevad kahte klassi: RF1 ja RF2. RF1 tunneb ära UAG ja UAA (stopp-koodon). RF2 tunneb ära teise stopp-koodoni, milleks on UGA ja UAA (Kisselev, 2002). Stopp-koodoni äratundmise järel aktiveerib RF1 või RF2 vastavalt sellele, milline stopp-koodon asub A-saidis, peptidüültransferaasi, mis hüdroolüüsib peptiidsideme polüpeptiidi ja tRNA vahel P-saidis. RF3 on vajalik RF1 või RF2 vabastamiseks ribosoomide koosseisust pärast polüpeptiidahela eemaldumist. Lõpuks on vajalik 50S subühiku dissotatsioon 70S posttranslatsioonilisest kompleksist, mis sisaldab tühja A-saiti, deatsetüleeritud tRNA-d ja mRNA-d. Selleks on vaja RRF ja EF-G osalust ning GTP hüdroolüüsi (Watson *et al.*, 2004).



Joonis 6. Ülevaade bakteriaalsest translatsioonist (Schmeing ja Ramakrishnan, 2009).

1.5 Ribosoomide degradatsioon

1.5.1 Ribosoomide lagunemise põhjused

Ribosoomide metabolism on üsna kulukas, kuna ribosomaalsete komponentide süntees hõlmab suure osa raku transkriptsioonilisest ja translatsioonilisest aktiivsusest. RNA-d jagatakse stabiilseks (rRNA ja tRNA) ja ebastabiilseks (mRNA). Võrreldes mRNA ulatusliku degradatsiooniga rakus, tundub rRNA ja tRNA stabiilsetena, mida nad ka enamasti on. Mõjutamine erinevate reagentidega või keskkonnatingimuste muutused võivad põhjustada nende degradatsiooni. Stressitingimustes lagundatakse siiski enamasti rRNA ning tRNA võib samadel tingimustel püsida stabiilsena (Deutscher, 2003). Stabiilse RNA lagundamisel osalevad ribonukleaasid (Kaplan ja Apirion, 1975). See, kas antud RNA lagundatakse või mitte, sõltub spetsiifilisest RNAasist ja juurdepääsust substraadile. rRNA degradatsioon võib toimuda ka kvaliteedikontrollis, mille käigus lagundatakse valesti kokkupandud ribosoomid (Deutscher, 2009). mRNA hulk rakus sõltub sellest, kas vastavat valku on rakul antud hetkel vaja või mitte. (Zundel *et al.*, 2006). Kasvavates rakkudes on rRNA enamasti stabiilne, kuid võib hakata lagunema, kui ribosoomide kokkupanek on häiritud või teatud keskkonnatingimuste muutustel, näiteks nälja korral. Samuti võivad ribosoomide lagunemist põhjustada mitmed erinevad reandid. Sellisteks aineteks on näiteks antibiootikumid,

detergendid, raskemetallid jne. Neile on iseloomulik see, et nad kahjustavad membraani ja nii RNA-s I pääseb rakku sisse (Deutscher, 2009; Maiväli *et al.*, 2013).

1.5.2 Nälg

Stabiilne RNA moodustab 98% kogu rakus leitavast RNA-st, olles hoiupaigaks paljudele toitainetele. Kõige sagedasemaks translatsiooniliselt aktiivsete ribosoomide lagunemise põhjuseks peetakse nälga. Erinevate toitainete ammendumine võib põhjustada kiiret RNA hulga langust (Deutscher, 2003). Kuna ribosoomide tööhoidmine on üsna energiakulukas, siis keskkonnatingimuste muutumisel ebasoodsateks on *E.coli*'le üsna iseloomulik ribosoomide ulatuslik lagundamine. On näidatud, et *Salmonella* tüvedes, mis jõuavad statsionaarsesse faasi, kus toitained hakkavad otsa saama ning kasv aeglustuma, lagundatakse 90% 23S rRNA-d ja ligikaudu 50% 16S rRNA-d. RNA degradatsiooni võib põhjustada näiteks süsiniku, fosfori, lämmastiku ning teiste toitainete ammendumine keskkonnast. Nälja uurimiseks erinevate toitainete puudumisel viiakse rakud söötmele, kus puudub vastav komponent. See aga erineb looduslikest tingimustest, kus ressursid ei saa mitte järsult otsa, vaid aegamisi (Deutscher, 2003). Ribosoomide lagundamist võivad põhjustada mitmed asjaolud. Näiteks võib toimuda muutused ribosoomide konformatsioonis ning ribosoomid muutuvad labiilseteks ja tundlikeks ribonukleaaside suhtes. Samuti võib tekkida olukord, kus näljatingimustes esineb rohkem ribosoomide kui neid tegelikult vaja läheb. Degradatsiooni suhtes on tundlikud nii 30S ja 50S subühikud. Katsed neomütsiiniga, mis takistab ribosoomi subühikute dissotsiatsiooni, näitasid, et ribosoomide degradatsioon oli 60% inhibeeritud (Zundel *et al.*, 2003). Stressi tõttu toimub endonukleolüütiline lõikamine ja sellele järgnev 16S ja 23S rRNA fragmentide eemaldamine eksoribonukleaaside poolt (Deutscher, 2009).

1.5.3 Kasvufaas

Ribosoomide metabolism on kulukas, kuna eksponentsiaalselt kasvavates rakkudes hõlmab rRNA süntees umbes 80% transkriptsioonilisest aktiivsusest ja r-valkude tootmine 25% translatsioonilisest aktiivsusest (Bremer ja Dennis, 1987). Kiiresti kasvavates *E. coli*'i rakkudes moodustavad ribosoomid kuni 28% raku kuivamassist (Bremer ja Dennis, 2008). Tavalistel kasvutingimustel on translatsiooniliselt aktiivsed ribosoomid stabiilsed (Zundel *et al.*, 2009). Ribosoomide degradatsiooni võivad põhjustada mitmed tegurid. Kuna ribosomaaalsete komponentide tootmine ja nende assembleerumine on pikk ja keerukas protsess, siis võib seal esineda defekte. Ribosoomide eluiga on üsna pikk ning selle aja jooksul võivad neid juhuslikult kahjustada mitmed kemikaalid, mis põhjustavad defekte funktsioneerimises. Ribosoomide degradatsiooni põhjustavad ka stress ning nälg. Samuti

toimub ribosoomide degradatsioon üleminekul eksponentsiaalsest kasvufaasist statsionaarsesse faasi (Piir *et al.*, 2011). Ribosoomid on stabiilsed ühtlaselt kasvavates rakkudes ja rakkudes, mis on jõudnud statsionaarsesse faasi.

1.5.4 Antibiootikumid ja ribosoomide lagundamine

Ribosoomide abil on võimalik realiseerida mRNA järjestuses peituv geneetiline informatsioon. tRNA-de ning ribosoomide abil luuakse polüpeptiid, mille aminohappeline järjestus vastab mRNA-s olevale järjestusele. Valgusüntees ehk translatsioon jaguneb kolmeks etapiks: initsiatsiooniks, elongatsiooniks ning terminatsiooniks. Kõik need kolm etappi on potentsiaalseteks sihtmärkideks antibiootikumidele (Nierhaus ja Wilson, 2004). Antibiootikumid on elusorganismide (seened, bakterid) poolt või tööstuslikult sünteesitud ained. Kuna translatsiooni viivad rakus läbi ribosoomid, siis nende mõjutamine erinevate reagentidega, sealhulgas ka antibiootikumidega, võib viia ulatusliku RNA degradatsioonini (Deutscher, 2003). Antibiootikumid võivad seonduda nii suure kui ka väikese subühikuga ning inhibeerida erinevaid protsesse. Klooramfenikol inhibeerib peptiidsideme moodustumist (Harms *et al.*, 2003), erütromütsiin takistab moodustunud peptiidahela ribosoomist väljumist, rifampitsiin seondub RNA polümeraasi β -subühikuga ning takistab RNA transkriptsiooni (Williams ja Piddock, 1998). Lisaks sellele võivad antibiootikumid mõjutada ka geenide ekspressiooni ja aktiveerida stressiga seotud geene (Siibak *et al.*, 2009).

Mitmed valgusünteesi inhibiitorid takistavad ribosoomi assembleerumist ning valesti kokkupandid ribosoomid võivad minna lagundamisele. Seda võib põhjustada antibiootikumi otsene seostumine ribosoomi prekursor osakestele. Kuid samas võib põhjus olla ka kaudne: koordinatsioon ribosoomi komponentide tootmisel läheb tasakaalust välja (Siibak *et al.*, 2009). Klooramfenikol oli üks esimesi antibiootikume, mille puhul märgati, et tema poolt põhjustatud mittestöihiomeetriline ribosoomaalsete valkude tootmine põhjustab ribosoomide kokkupanekul defekte (Nierhaus ja Wilson, 2004). Klooramfenikol inhibeerib peptiidsideme moodustumist (Harms *et al.*, 2003). Erütromütsiin aga takistab moodustunud peptiidahela ribosoomist väljumist. Nii 23S kui ka 16S rRNA-d leiti osakestest, mis sadenesid aeglasemalt kui 50S ja 30S, mis viitas sellele, et klooramfenikol kui ka erütromütsiin mõjutavad lisaks suure subühiku kokkupanekule ka väikese subühiku biosünteesi (Siibak *et al.*, 2009). Ribosoomide degradatsiooni põhjustab ilmselt asjaolu, et õigesti assembleerunud ribosoomid on kaitstud endonukleasidest eest, samas kui valesti kokkupandud ribosoomid on tundlikud nende ensüümide aktiivsuse suhtes (Deutscher, 2009).

1.5.5 Ensüümid, mis osalevad rRNA lagundamisel

Mitmed reagentid mõjutavad rakumembraani nii, et aktiivne periplasmaatiline RNAas I pääseb rakku. Seda ensüümi leidub ka inaktiivsena intratsellulaarselt. See saavutatakse arvatavasti redutseeriva keskkonna ning inhibiitori koostöö tulemusena. Päris täpselt ei teata, kas ka tavatingimustes, kus rakke ei ole mõjutatud kemikaalidega, põhjustab RNAas I rRNA degradatsiooni. Teada on, et RNAas I omab degradeerivat aktiivsust kõrgendatud temperatuuridel (45°-50° C) (Deutscher, 2009).

Nii PNPaas kui ka RNAas II osalevad antibiootikumide poolt indutseeritud 23S rRNA lagundamisel. PNPaas koos RNA helikaasiga või RNAas R on võimeline lagundama kõrgelt struktureeritud RNA-d (Deutscher, 2009). RNAas II ja RNAas R on mõlemad 3'-5' eksoribonukleasid. RNAas R suudab lagundada kõrgelt struktureeritud RNA-d ilma helikaasi abita. RNAas II suudab lagundada ainult üheaheelalist RNA-d (Vincent ja Deutscher, 2009). Rakud, milles puuduvad PNPaas ja RNAas R, ei ole eluvõimelised. Nende kahe ensüümi puudumisel kuhjuvad rRNA fragmendid ning selle tulemusena on häiritud nii ribosoomide maturatsioon kui ka kokkupanek ja rakud surevad lõpuks (Cheng ja Deutscher, 2003).

RNAas PH on 3'-5' suunaline eksoribonukleas, mis osaleb ribosoomide degradatsioonil näljatingimustes, kuid ei oma tähtsat rolli kvaliteedikontrollis. RNAas PH lõikab 16S rRNA 3' otsa ning selle tulemusena initsieeritakse endonukleolüütiline lõikamine, mis on vajalik lagundamisprotsessiks näljatingimustes (Basturea *et al.*, 2011).

Degradosoomi põhikomponentideks on RNAas E (endonukleas) ja PNPaas (3'-5' suunaline eksonukleas). Lisaks neile kahele ensüümile leidub seal veel RNA helikaas ning paljud teised valgud. Degradosoomi ülesandeks on mRNA degradeerimine. Lisaks sellele on degradosoomist leitud ka stabiilse RNA fragmente (Maiväli *et al.*, 2013). RNAas E interakteerub PNPaasiga. PNPaas on olulisel kohal RNA lagundamisel (Bessarab *et al.*, 1998). Valesti kokkupandud rRNA degradatsiooni alustab ilmselt endonukleas. Vajalik on ka degradeerimisele määratud osakeste polüadenülatsioon (Maes *et al.*, 2011) ning nii muutuvad need substraatideks kahele ensüümile, milleks on PNPaas ja RNAas R (Basturea *et al.*, 2011).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Töö eesmärgiks on uurida, kas valgusünteesi inhibeerivate antibiootikumid põhjustavad ribosoomide lagundamist.

Antibiootikumid, mis takistavad valgusünteesi, peatavad raku kasvu. Eelnevalt on kirjeldatud, et antibiootikumid, nagu näiteks klooramfenikol ja erütromütsiin, takistavad ribosoomide kokkupanekut, kuna ribosomaalste valkude tootmine muutub ebastõhhiomeetriliseks (Siibak *et al.* 2009; Siibak, ja Remme, 2010; Siibak *et al.* 2011). Antud töös püüame leida vastust küsimisele, kas valgusünteesi inhibeerivate antibiootikumide, erütromütsiini ja klooramfenikoli, poolt põhjustatud defektid ribosoomide kokkupanekul võivad põhjustada ka nende lagundamist. Lisaks küsime, kas lagundatakse ainult neid ribosome, mis on sünteesitud AB juureolekul või ka neid, mida on sünteesitud ilma AB juureolekuta.

2.2 Materjalid ja meetodid

2.2.1 Kasutatud tüved ja konstruktid

Töös kasutati järgmisi tüvesid:

Keio metsiktüüpi isogeenne tüvi [*rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514 Δ(araBAD)567 Δ(rhaBAD)568 rph-1*] (Datsenko ja Wanner, 2000).

RNAas R⁻ tüvi Keio kollektsioonist (Baba *et al.* 2006).

MG 1655 RNAas I⁻ (F- *lambda- ilvG- rfb-50 rph-1*) (Basturea *et al.* 2010).

MG 1655 - puudub RNAas PH ja RNAas I (Blattner *et al.*, 1997; Soupene *et al.*, 2003)

Mutantsed tüved, milles puuduvad üks või mitu eksoribonukleasi: RNAas R, RNAas II või PNPaas (Yancey ja Kushner, 1990) ja RNAas I⁻ (Datsenko ja Wanner, 2000; Datta *et al.*, 2006):

- MG 1655 I⁻, II⁻ - puuduvad RNAas I ja RNAas II
- MG 1655 I⁻, II⁻, R⁻ - puuduvad RNAas I, RNAas II ja RNAas R
- MG 1655 I⁻, II⁻, R⁻, PNPaas⁻ - puuduvad RNAas I, RNAas II, RNAas R ja PNPaas

MG 1655 *- samad konstruktid, sisse on ainult viidud RNAas PH geen (*rph*).

Töös kasutati järgmisi konstrukte:

Oligo 16S: 370 Fluo (GCAATATTCCCCACTGCTGCCTC)

Oligo 23S: 25h Fluo (CGCCTAAGCGTGCTCCCACTGCCTG)

pBAD – hübriid konstrueerimine on kirjeldatud töös Piir *et al.* Promooti taha oli pandud rrnB operon, kuhu oli kloneeritud MS2 RNA aptameer 16S rRNA jaoks (Youngman ja Green, 2005) ja streptavidiini aptameer 23S rRNA jaoks (Leonov *et al.*, 2003).

2.2.2 Northern blot

Northern blot on meetod, mida kasutatakse selleks, et detekteerida spetsiifilisi RNA molekule RNA molekulide segust. Esiteks tuleb RNA ahelad denatureerida. Seejärel eraldatakse RNA molekulid vastavalt suurusele geelelektroforeesil ja kantakse positiivse laenguga nailon membraanile (Hybond +). Pärast ülekannet geelilt paberile, hübriseeritakse seda spetsiifilise prooviga, mis sisaldab järjestust, mis on komplementaarne teatud osale RNA molekulist, mida soovitakse uurida. Hübridisatsiooni käigus tekkinud kompleksi on võimalik edasi uurida tänu sellele, et proov sisaldab flouresentsmärgist, millele on võimalik siduda antikeha, mis on konjugeeritud aluselise fosfataasiga. CDP-Star kemoluminiseeriva detektsiooni reagent kasutab antikeha Fab fragmendiga konjugeeritud aluselist fosfataasi selleks, et katalüüsida stabiliseeritud dioksüetaani lõikamist.

2.2.3 Rakkude kasvatamine

See katse on tehtud Siibak *et al.* 2009 aasta katse järgi. Rakke kasvatati 37 °C juures üleöö LB söötmes ja 200 ml rakke viidi 15 ml YT söötmesse ja kasvatati 25 °C ja 37 °C juures optilise tiheduseni 0,2 ühikut. Pärast seda lisati rakkudele antibiootikumid (kontrollkultuurile mitte), klooramfenikoli lõppkontsentratsioon oli 7 µg/ml ja erütromütsiini lõppkontsentratsioon oli 100 µg/ml. Pärast seda inkubeeriti rakke, mida töödeldi erütromütsiiniga 2 tundi ja rakke, millele lisati klooramfenikol, inkubeeriti 1 tund. Seejärel tsentrifuugiti proovid lauatsentrifuugis 10 minutit 4 Krpm 4 °C juures.

2.2.4 RNA puhastamine rakkudest

Kontrollkultuur võeti üles 1% SDS sisaldavas TEN-s (LISA 1). Seejärel lisati igasse eppendorfi 480 µl 1x TEN-is suspendeeritud kontrollkultuuri. (enne pipeteerimist tuli veenduti, et rakkude suspensioon oleks ühtlane) ning 120 µl 5% Brij. Kui see oli tehtud, lisati 60 µl 10% SDS ja 600 µl fenooli, segati vortexil ja siis inkubeeriti 10 minutit 65 °C juures.

Pärast inkubatsiooni tsentrifuugiti 10 minutit 13 Krpm juures toatemperatuuril, eemaldati vesifaas ja koguti uude eppendorfi. Fenooli etappi tuli korrata, kõik jäi samaks, kuid nüüd toimus inkubatsioon loksutil. Pärast tsentrifuugimist tõsteti vesifaas uude eppendorfi ja lisati fenooli:kloroformi segu (1:1), inkubeeriti 10 minutit loksutil, pärast seda tsentrifuugiti 10 minutit 13 Krpm 4 °C juures. Eemaldati vesifaas, koguti see uude eppendorfi ja lisati 600 µl kloroformi, inkubeeriti 10 minutit loksutil. Tsentrifuugiti 1 minut 13 Krpm juures ja eemaldati supernatant. Lisati 96 % etanooli ja hoiti vähemalt 2 tundi -20 °C kapis. Seejärel tsentrifuugiti neid 15 minutit 13 Krpm 4 °C juures. Eemaldati supernatant ja lisati 70 % etanooli, misjärel tsentrifuugiti 10 minutit 13 Krpm 4 °C juures. Vedelik eemaldati ja proovid suspendeeriti 660 µl 1 x LLP-s (LISA 1).

2.2.5 Proovide ettevalmistamine

Proovi ettevalmistamiseks segati kokku järgmine lahus:

- 15 ml formamiidi
- 5,4 µl formaldehüüdi
- 3 µl 10 x MOPS (LISA 1)
- 10 µg RNA-d, maksimum 6,6 µl

Enne RNA lisamist mõõdeti RNA kontsentratsiooni, et teha lahjendus nii, et RNA lõppkontsentratsioon oleks 2 µg/µl dH₂O-s. Seejärel valmistati 20 x lahjendussegu nii, et RNA-d saaks igasse eppendorfi lisada 5 µl.

2.2.6 Geeli valmistamine

Geeli valmistamiseks segati kokku:

- 2,25 g agarosi
- 127 ml mQ
- 15 ml MOPS-i (LISA 1)
- 8,1 ml formaldehüüdi

Agaroos ja mQ segati kokku ning sulatati mikrolaineahjus, seejärel lisati ülejäänud komponendid.

2.2.7 Ülekanne geelilt membraanile

Nylon N+ membraan (Roche) ja 2 Whatmani paber (3 MM) eelniisutati 10 x SSC-ga. Geeli loputati alguses mQ-ga ja seejärel 10 x SSC-ga. Geel asetati vanni kohal olevale klaasile, mille peale pandi membraan. Whatman paberist lõigati 2 nailonmembraani suurust tükki ja asetati membraani peale. Whatmani peale asetati 7-8 cm paksune kuhi paberrätikuid. Nende peale pandi mõnesajagrammine raskus. Ülekanne kestis üleöö.

2.2.8 Hübridisatsioon

20-30 ml hübridisatsioonipuhvrit eelsoojendati 65 °C juures. Seejärel asetati membraan hübridisatsioonitorusse ning see viidi 42 °C kappi 1,5 tunniks. Pärast eelhübridisatsiooni lisati paar 100 pikomooli flouresentsmärgisega oligod (16S: 370 Fluo ja 23S: 25h Fluo) ja hübridiseeriti 42 °C juures üleöö.

2.2.9 Membraani pesemine

Membraani inkubeeriti 2x5' 250 ml Pesu I lahusega (LISA 1) loksutil toatemperatuuril. Sellele järgnes 2x15' 250 ml pesu Pesu II (LISA 1) lahusega, mida on eelnevalt soojendatud 48 °C vannis. Seejärel loputati membraani 2 korda 50-100 ml 1 x MAB (LISA 1), et lahti saada SDS jääkidest.

2.2.10 Blokeerimine ja antikeha detektsioon

Membraanile lisati blokeerimislahus (LISA 1) ja hoiti 1,5 tundi loksutil. Lisati 3 µl antikeha ja loksutati veel 30 minutit. Seejärel pesti 2 korda 20 minutit 250 ml 1 x MAB + Tween 20 seguga. Pärast seda lisati 50 ml detektsioonilahust (LISA 1) ja inkubeeriti 3 minutit. Sama etappi korrati veel ühe korra ja lõpuks lisati CDP-Star (1,6 ml). CDP-Star kemoluminisentsi detektsiooni reagent (Amershami) kasutab antikeha Fab fragmendiga konjungeerunud aluselist fosfataasi selleks, et lõhustada stabiliseerunud dioksüetaani, mille tagajärjel eraldub valgus.

2.2.11 Oligo mahapesemine filtrilt

Valmistati lahus:

- 500 ml dH₂O
- 5 ml 10 % SDS
- 5 ml 0,5 mM EDTA (pH 8)

Lahust kuumutati keemiseni, millele järgnes filtrit inkubeerimine 2x 50 ml 10 minutit. Sama etappi korrati. Seejärel asetati filter kilest kaante vahele, sulatati kilekaante otsad kinni ja pandi filter 4 °C kappi.

2.3 Korrektselt assambleeritud ribosoomide stabiilsus antibiootikumide juuresolekul

2.3.1 pBAD promootori aktivatsioon/inhibitatsioon

RNAas R⁻ tüvi kasvatati üleöö 3 ml LB söötmes, kuhu lisati 1.5 µg ampitsilliini (200 µg/ml ampitsilliini). Järgmisel päeval kasutati promootori aktivatsiooniks 2 ml 0,1% arabinoosi sisaldavat MOPS söödet (LISA 2) ning represseerimiseks kasutati 2 ml 0,1% glükoosi sisaldavat MOPS söödet (LISA 2). Eelnevalt 15 minutit 37°C juures soojendatud MOPS-arabinoosi söötmele lisati 20 µl üleöö kasvanud kultuuri. Seejärel jäi kultuur 37 °C juurde loksuma kuni oli saavutanud optilise tiheduse 0,2 A₆₀₀ ühikut. Sellele järgnes söötme vahetus, kus indutseeriva toimega MOPS-arabinoos sööde asendati represseeriva glükoosi söötmega. Söötme vahetuseks tuli 2 ml kasvanud kultuuri viia 2 ml mikrotuubi ja tsentrifuugida 10 minutit 3000 rpm toatemperatuuril. Suspensiooni eemaldamisele järgnes 2 ml glükoosi sisaldava söötme lisamine ja 2 µl antibiootikumi lisamine (klooramfenikol 50 mg/ml).

2.3.2 Rakkude märkimine [H]³ uridiiniga

Katsekultuurile, mis oli saavutanud optilise tiheduse lisati 0,2 A₆₀₀ ühikut 40 µl [H]³ uridiini (lõppkontsentratsioon 1 µCi/ µl, eriaktiivsus 35,6 Ci/mmol) ning kasvatati 30 minutit loksutil 37 °C juures. Sellele järgnes tsentrifuugimine 10 minutit 3000 rpm juures toatemperatuuril. Eemaldati supernatant ning rakusade võeti üles 2 ml glükoosi sisaldavad MOPS söötmes. Katsekultuur pandi tagasi 37 °C juurde loksuma. Teatud aja möödudes võeti ajapunktid. Ajapunktide võtmiseks tsentrifuugiti 200 µl katsekultuuri 13 000 rpm 1 minut 4 °C juures. Eemaldati supernatant ning sade viidi -80 °C kappi. Ajapunkte oli kokku 5: 0,5 h; 1 h; 2 h; 4 h; 6 h.

2.3.3 RNA puhastamine rakulüsaadist

Kasutati sama meetodit, mis punktis 2.2.4

2.3.4 16S rRNA eraldamine

Kolonne pandi 150 µl amüloosi. Seejärel pesti kolonne 2 korda 500 µl CB-ga (LISA 2) ja pärast seda 2 korda 500 µl BP-ga (LISA 2) (kolonne viidi 200 µl BP, suspendeeriti ja viidi 200 µl lahust eppendorfi ning lisati 6 µl MBP (maltose binding protein). Hoiti 10 minutit end-

over-end segajal 4 °C juures. Pärast seda lisati 300 µl RNA-d ja viidi tagasi 30 minutiks end-over-end segajale 4 °C ruumi. Poole tunni möödudes koguti lahus kolonni tagasi ja pesti 5 korda 500 µl BP-ga 4 °C ruumis. Kui see oli tehtud, asetati kolonnid eppendorfide kohale, lisati 300 µl EB-d (elueerimispuhver) (LISA 2) ja kaaned sulgeti. Nii hoiti 30 minutit, eluaadist mõõdeti optiline tihedus 260 nm juures ja radioaktiivsus.

2.3.5 23S rRNA eraldamine

Eppendorfis olevale 300 µl RNA-le lisati 20 µl streptavidiini (GE Healthcare Bio-Sciences AB), segati vortexil. Asetati end-over-end segajale 4 °C ruumis ja hoida seal üleöö. Järgmisel päeval tsentrifuugiti 1 minutit 5,6 Krpm juures. Eemaldati 250 µl supernatanti. Seejärel pesti 5 x 800 µl 1 x LLP-ga (LISA 2). Esimese, teise, kolmanda ja neljanda pesu järel eemaldati 800 µl supernatanti, kuid viimase pesu järel eemaldati 600-610 µl supernatanti. Iga LLP pesu järel tsentrifuugiti 1 minut 5,6 Krpm juures. Pärast pesu lisati 20 µl 100 mM biotiini ja hoiti üleöö end-over-end segajal 4 °C ruumis. Järgmisel päeval mõõdeti radioaktiivsus ja optiline tihedus 260 nm juures.

2.4 Minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni määramine

2.4.1 Rakkude lahjenduste valmistamine

Kasutati tüvesid, millel puudus üks või mitu eksonukleaasi. Katses kasutasime kümmet tüve: MG1655 I, millel puudus RNaa I, MG 1655 I, II⁻ - puuduvad RNaa I ja RNaa II, MG 1655 I, II⁻, R⁻ - puuduvad RNaa I, RNaa II ja RNaa R, MG 1655 I, II⁻, R⁻, PNPaas⁻ - puuduvad RNaa I, RNaa II, RNaa R ja PNPaas. MG 1655 *- samad konstruktid, sisse on ainult viidud RNaa PH geen (rph), RNaa R⁻ tüvi ja metsiktüüpi tüvi Keio kollektsioonist.

Rakkud pamdi eelmisel päeval kasvama LB söötmesse 37 °C juures. Rakkude optiline tihedus mõõdeti 600 nm juures ning seejärel tehti 10 x lahjendused.

2.4.2 Antibiootikumide lahjenduste valmistamine

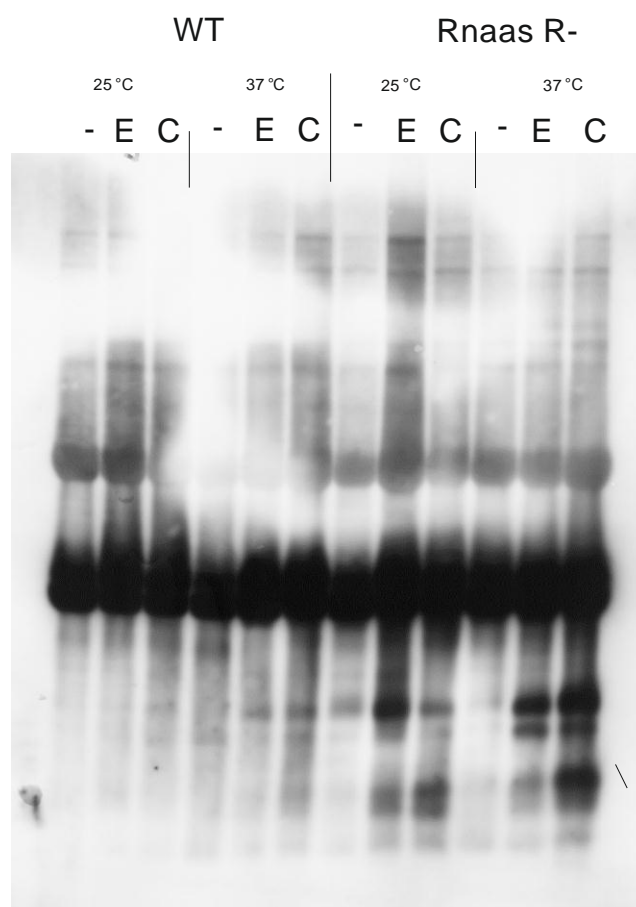
Antibiootikumidest kasutati erütromütsiini, klooramfenikoli, rifampitsiini ja trimetoprimmi. Erütromütsiini algkontsentratsioon oli 80 mg/ml ning lõppkontsentratsioon 0,078125 mg/ml. Lahjendusi tehti üle 2x lahjenduste vees. Sama tehti ka klooramfenikoli ja rifampitsilliiniga. Kuna trimetoprimiga ilmnes efekt alles kõige madalamal kontsentratsioonil, siis oli vaja teha 10 000 x lahjendus. Algkontsentratsioon oli 160 mg/ml, vaja oli saada 0,16 µg/ml. Selleks tehti 1000x lahjendus (1ml: 10 µl antibiootikumi ja 990 µl LB-d), milles omakorda tehti veel üks 1000x lahjendus (10 µl antibiootikumi ja 990 µl LB-d). Saadi 100x-ne lahjendus,

trimetoprimmi algkontsentratsioon katses oli 0,078125 µg /ml, millest edasi tehti lahjendusi üle 2 x lahjenduste vees ja lõppkontsentratsiooniks saadi $3,814 \times 10^{-5}$ µg/ml. Kui plaadid olid valmis, siis inkubeeriti neid 30 °C juures 20 tundi või 40 tundi.

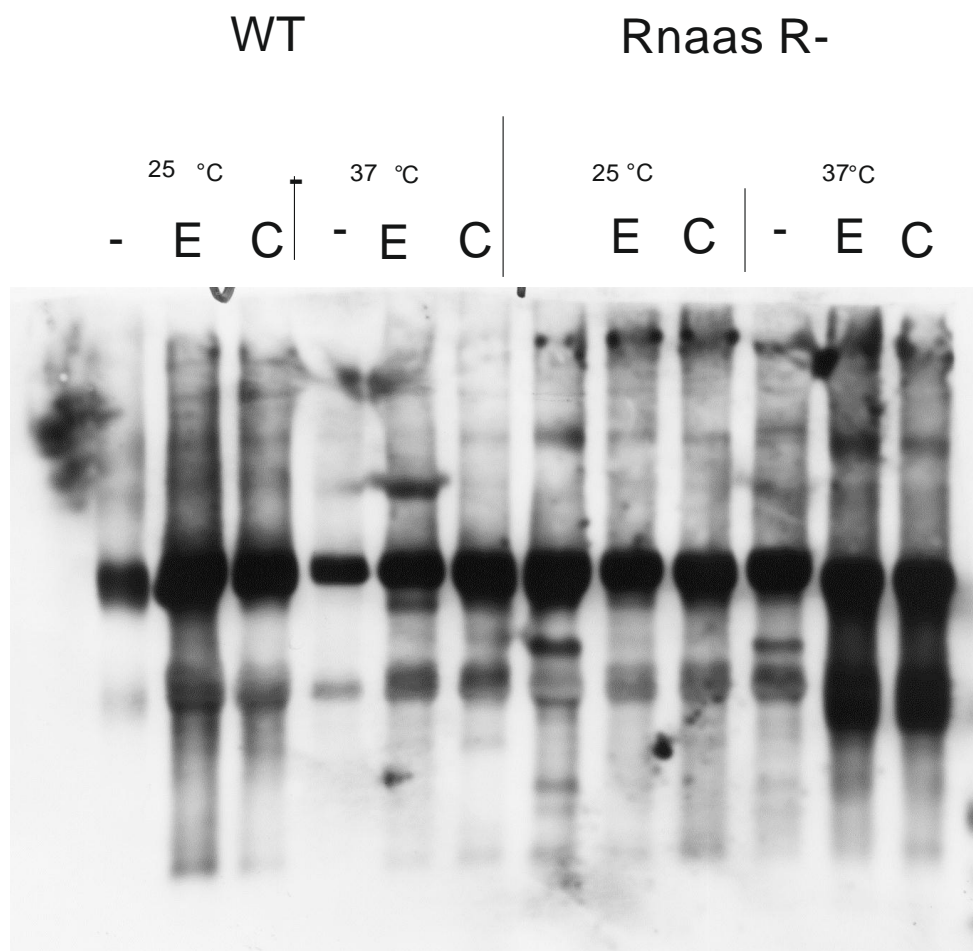
2.5 Tulemused

2.5.1 Ribosomaalse RNA fragmenteerimise määramine Northern blot meetodiga

Totaalse ribosomaalse RNA fragmenteerituse uurimiseks antibiootikumide juuresolekul kasvatati kahte tüve (RNAas R⁻ ja sellega isogeennset metsiktüüpi tüve; Baba *et al.*, 2006) 25 °C ja 37 °C juures vastavate antibiootikumidega (erütromütsiin lõppkontsentratsiooniga 100 µg/ml ja klooramfenikol lõppkontsentratsiooniga 7 µg/ml). Katsetingimused valiti identsena Siibaku ja teiste tööga (Siibak *et al.*, 2009), kus uuriti antibiootikumide mõju ribosoomide kokkupanekule. Pärast tüvede kasvatamist rikkas söötmes eraldati RNA ja kanti geelile. Geelelektroforeesile järgnes ülekanne membraanile, millele järgnes hübridisatsioon 23S ja 16S rRNA spetsiifiliste RNA oligodega.



Joonis 7. Northern blot 16S rRNA vastase oligoga 370 Fluo. Wt – Keio metsiktüüpi tüvi, RNAas R⁻ - tüvi Keio kollektsioonist C-klooramfenikol, E-erütromütsiin.



Joonis 8. Northern blot 23S rRNA vastase oligoga h25-Fluo. Wt – Keio metsiktüüpi tüvi, RNAas R⁻ - tüvi Keio kollektisioonist C-klooramfenikol, E-erütromütsiin.

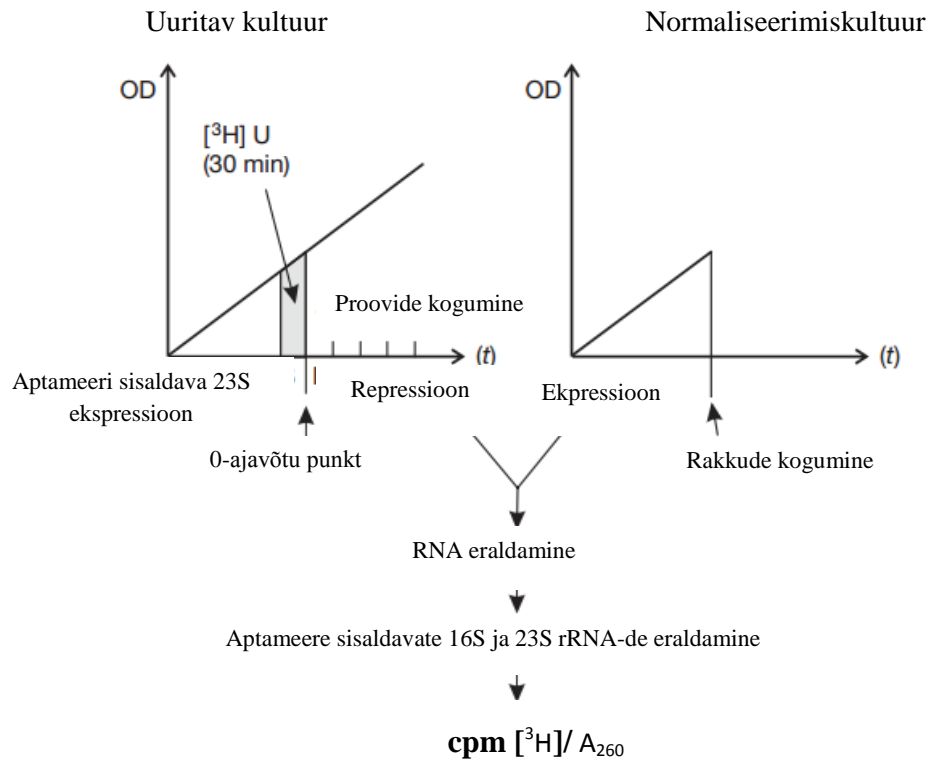
Katse viidi läbi 25 °C ja 37 °C juures, kuna ribosoomide kokkupaneku defektid ilmnevad selgemini madalamatel temperatuuridel (Siibak *et al.*, 2009). Katse tulemusena võib näha, et metsiktüüpi tüves antibiootikumide lisamine ei tekita erinevusi ribosoomiaalsete RNA fragmentide pikkuses, kuid RNAas R⁻ tüves esinevad erinevused rRNA fragmentide pikkustes. RNAas R⁻ tüvedes, mida kasvatati 25 °C ja 37 °C juures erütromütsiini ja klooramfenikoli juuresolekul, kuhjuvad nii 16S rRNA kui 23S rRNA fragmendid, mida metsiktüüpi tüvedes ei leidu (Joonised 7 ja 8). See tulemus viitab, et valgusünteesi inhibeerivate antibiootikumide mõjul toimub rakkudes ribosoomide lagundamine. Tõenäoline stsenaarium on, et ribosoomide lagundamine toimub nii metsiktüüpi kui RNAas R tüves, kuid metsiktüüpi tüves likvideeritakse tekkinud fragmendid RNAas R poolt sedavõrd kiiresti, et neid ei ole võimalik Northern blotiga detekteerida. RNAas R arvatakse olevat üks põhilistest rRNAd lagundavatest eksonukleasidest (Deutscher, 2009).

2.5.2 Korrektselt assambleeritud ribosoomide stabiilsus antibiootikumide juuresolekul

Meie laboris tehtud katsed on seniajani näidanud, et mittekasvavates rakkudes olemasolevaid ribosoomide ei lagundata (Piir et al. 2011 ja Anton Paier, käsikiri valmimisel). Et näha, kas see kehtib ka rakkude kohta, mille kasv on peatatud antibiootikumide lisamise poolt, määrasime me ka enne antibiootikumide lisamist normaalsetes kasvutingimustes sünteesitud ribosoomide stabiilsuse antibiootikumide juuresolekul. Selleks kasutasime töös Piir *et al.* (2011) juurutatud katsesüsteemi. Ribosoomide degradatsiooni uurimiseks kloneeriti arabinoosi poolt indutseeritav pBAD promootori kontrolli alla rRNA operon *rrnB*. 23S rRNA välja puhastamiseks kloneeriti konstrukti streptavidiini siduv aptameer ja 16S rRNA jaoks MS2 RNA aptameer (joonis 9). Selle abil on võimalik eristada meid huvitavaid ribosoomide, mis on sünteesitud enne antibiootikumi lisamist teistest rakus sünteesitud ribosoomidest. Rakud, mis ekspresseerisid plasmiidset rRNA-d, kasvatati eksponentsiaalsesse kasvufaasi ($OD_{600}=0,2$), misjärel märgistati rakke 30 minuti jooksul radioaktiivse uridiiniga. Sellele järgnes söötme vahetus, pandi peal inhibeeriva toimega sööde ning lisati ka antibiootikum. Selle tulemusena inhibeeriti rRNA operoni süntees pBAD promootorilt (kuid mitte seitsmelt kromosomaalselt operonilt). Järgmise etapina koguti ajapunktides 200 μ l uuritavat kultuuri, mis normaliseerimiseks segati 100-kordse ülehulgaga mitteradioaktiivse kultruuriga. Eesmärgiks oli normaliseerida proovisisest varieeruvust lüüsil ning aptameeridega rRNA puhastamisel. Seejärel eraldati 16S rRNA rakulüsaadist, kasutades amüloos maatriksit, millele seoti MBP-MS2-His liitvalk. Streptavidiini siduvat aptameeri sisaldav 23S rRNA puhastati välja kasutades streptavidiin-agarooos maatriksit. Seejärel mõõdeti puhastatud 16S rRNA ja 23S rRNA radioaktiivsus ja optiline tihedus 260 nm juures (joonis 10). Radioaktiivsus, mis leiti katsekultruuri lülitatud uridiini järgi normaliseeriti 260 nm juures leitud optilise tihedusega, mis pärineb ülekaalukalt normaliseerimiskultuurist. Seega pärineb kokkusegatud kultuuride RNast üle 90% normaliseerimiskultuurist, samas kui 100% radioaktiivsust pärineb katsekultuurist (Piir *et al.*, 2011). Kui radioaktiivsus ajas langeb, siis viitab see aptameeri omava rRNA lagundamisele.

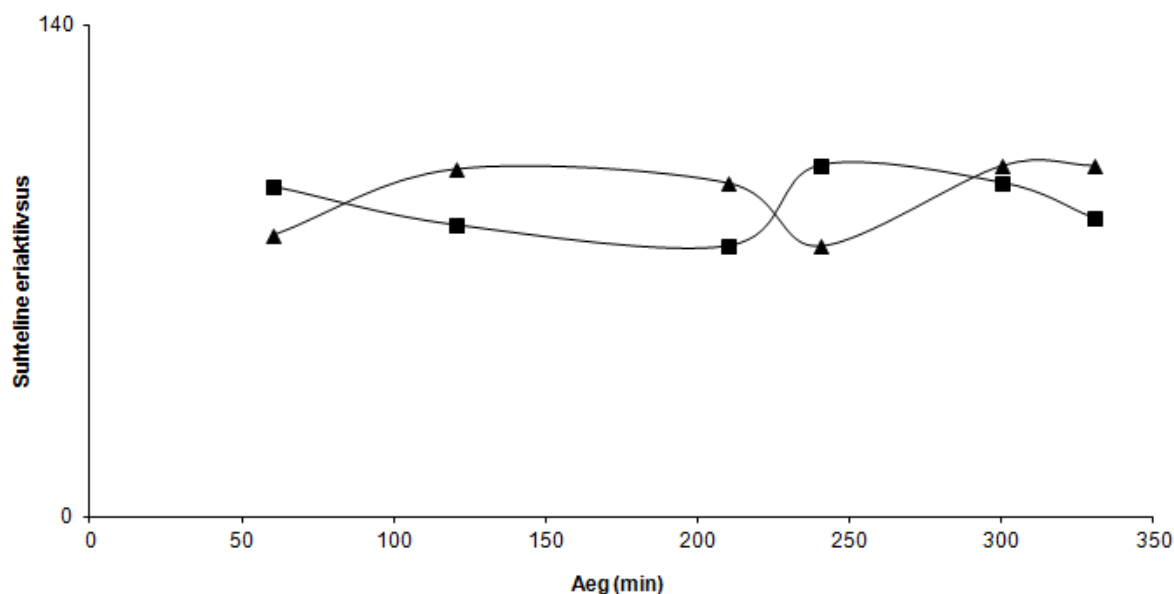


Joonis 9. Plasmidi konstruktsioon. 16S rRNA eraldamiseks lisati MS2 RNA aptameer ja 23S rRNA eraldamiseks lisati streptavidiini siduv aptameer (Piir *et al.*, 2011).



Joonis 10. Katse ülesehitus (Piir *et al.*, 2011).

Meie katses kasvatati RNAas R⁻ tüve arabinoosi sisaldavas söötmes, mis aktiveerib pBAD promootorit, et saada ribosome, mida on võimalik hiljem eristada teistest antibiootikumi juuresolekul sünteesitud ribosoomidest. Katse tulemusel ei nähtud aptameeri sisaldavate rRNAde eriaktiivsuste langust (joonis 11). Seega osutusid enne antibiootikumi lisamist sünteesitud ribosoomid 6 tundi väldanud katse kestel stabiilseks. Seega on tõenäoline, et ribosoomid püsivad antibiootikumide juuresolekul stabiilsena.



Joonis 11. Aptameeri sisaldavate 16S rRNA ja 23S rRNA stabiilsus klooramfenikoli juuresolekul. Ruudud tähistavad 16S rRNA-d ja kolmnurgad 23S rRNA-d. Suhteline eriaktiivsus on puhastatud rRNA-de radioaktiivsus / optilise tihedus 260 nanomeetri juures (joonis 10).

2.5.3 Antibiootikumide minimaalse inhibeeriva kontsentratsiooni määramine

Kuna me nägime erütromütsiini ja klooramfenikoli juuresolekul ribosoomide degradatsiooni, otsustasime vaadata, millist mõju avaldavad antibiootikumid nendele tüvedele, milledest on deleteeritud erinevad kombinatsioonid RNAasidest võrreldes isogeense tüvega, kus leidsid vastavad ribonukleaasid (välja arvatud RNAas I). Need tüved on kingitud M. Deutscher poolt Miami Ülikoolist meie laborile. Kasutati kahte valgusünteesi inhibiitorit: erütromütsiini ja klooramfenikoli. Lisaks kasutati rifampitsiini, mis on RNA polümeraasi inhibiitor ja trimetoprimmi, mis inhibeerib dihidrofolaadid reduktaasi. Kõik siin katses kasutatud antibiootikumid on bakteriostaatilised ehk nad inhibeerivad bakterite kasvu, kuid ei tapa neid. Selleks me kasvasime rakke erinevatel antibiootikumide kontsentratsioonidel 30 °C juures ja mõõtsime ühe ööpäeva möödudes optilist tihedust 600 nm juures, kasutades selleks Sunrise™ universaalset mikroplaatide absorptsiooni mõõtet. Bakteri kasvuks loeti OD₆₀₀ näidud $\geq 0,1$ (tabelites 1-4 tähistatud roheliselt).

Tabel 1. Erütromütsiini minimaalsed inhibitoorsed kontsentratsioonid

Kontsentratsioon	20 mg/ml	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625	0,078125
RNaas R ⁻ (Baba <i>et al.</i> 2006)	0,055	0,14	0,163	0,264	0,377	0,602	0,638	0,712	0,573
MG 1655 I ⁻	0,099	0,125	0,23	0,447	0,582	0,668	0,698	0,76	0,736
MG 1655* I ⁻	0,049	0,121	0,211	0,348	0,454	0,668	0,723	0,799	0,746
MG 1655 I, II, R ⁻	0,046	0,046	0,062	0,252	0,381	0,482	0,546	0,614	0,722
MG 1655* I, II, R ⁻	0,071	0,122	0,181	0,42	0,543	0,719	0,829	0,956	0,946
MG 1655 I, II, R ⁻ , PNPaa ⁻	0,042	0,048	0,031	0,037	0,115	0,321	0,564	0,589	0,535
MG 1655* I, II, R ⁻ , PNPaa ⁻	0,044	0,046	0,035	0,037	0,046	0,229	0,085	0,456	0,064
Keio wt (Datsenko ja Wanner, 2000)	0,055	0,111	0,218	0,384	0,497	0,734	0,85	0,851	0,331

Tabel 2. Klooramfenikoli minimaalsed inhibitoorsed kontsentratsioonid

Kontsentratsioonid	20 mg/ml	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625	0,078125
RNaas R ⁻ (Baba <i>et al.</i> 2006)	0,035	0,041	0,026	0,027	0,034	0,109	0,127	0,2	0,261
MG 1655 I ⁻	0,037	0,039	0,026	0,027	0,036	0,175	0,144	0,228	0,217
MG 1655* I ⁻	0,037	0,039	0,028	0,028	0,036	0,043	0,158	0,244	0,268
MG 1655 I, II, R ⁻	0,037	0,04	0,026	0,028	0,036	0,04	0,04	0,121	0,183
MG 1655* I, II, R ⁻	0,034	0,042	0,024	0,026	0,034	0,039	0,036	0,193	0,258
Keio wt (Datsenko ja Wanner, 2000)	0,038	0,035	0,026	0,029	0,038	0,043	0,127	0,213	0,238

Tabel 3. Rifampitsiin minimaalsed inhibitoorsed kontsentratsioonid

Kontsentratsioon	20 mg/ml	10	5	2,5	1,25	0,625	0,3125	0,15625	0,078125
RNaas R ⁻ (Baba <i>et al.</i> 2006)	0,057	0,052	0,03	0,027	0,038	0,046	0,127	0,224	0,308
MG 1655 I ⁻	0,06	0,055	0,031	0,03	0,04	0,092	0,04	0,149	0,266
MG 1655* I ⁻	0,055	0,052	0,03	0,03	0,038	0,05	0,049	0,191	0,209
MG 1655 I, II, R ⁻	0,058	0,056	0,031	0,031	0,039	0,046	0,036	0,141	0,188
MG 1655* I, II, R ⁻	0,053	0,052	0,028	0,03	0,038	0,046	0,253	0,283	0,249
MG 1655 I, II, R ⁻ , PNPaa ⁻	0,057	0,053	0,029	0,029	0,037	0,044	0,12	0,178	0,313
MG 1655* I, II, R ⁻ , PNPaa ⁻	0,055	0,051	0,03	0,029	0,04	0,044	0,034	0,041	0,047
Keio wt (Datsenko ja Wanner, 2000)	0,06	0,054	0,031	0,03	0,044	0,046	0,039	0,264	0,23

Tabel 4. Trimetoprimmi minimaalsed inhibitoorsed kontsentratsioonid

Kontsentratsioon	0,01953	0,009766	0,004883	0,002441	0,001221	0,00061	0,000305	0,000153	7,63E-05	3,81E-05
MG 1655 I ⁻	0,031	0,103	0,177	0,471	0,539	0,621	0,623	0,583	0,683	0,758
MG 1655* I ⁻	0,029	0,066	0,136	0,296	0,539	0,684	0,752	0,464	0,7	0,684
MG 1655 I, II	0,029	0,133	0,314	0,436	0,65	0,664	0,619	0,665	0,567	0,571
MG 1655* I, II	0,022	0,082	0,268	0,431	0,482	0,54	0,837	0,808	0,474	0,574
MG 1655 I, II, R ⁻	0,032	0,145	0,358	0,386	0,506	0,459	0,535	0,568	0,448	0,453
MG 1655* I, II, R ⁻	0,033	0,074	0,375	0,503	0,696	0,868	0,909	0,862	0,843	0,825
MG 1655 I, II, R ⁻ , PNPaa ⁻	0,032	0,054	0,075	0,194	0,31	0,304	0,338	0,322	0,323	0,392
MG 1655* I, II, R ⁻ , PNPaa ⁻	0,033	0,068	0,064	0,138	0,193	0,298	0,329	0,292	0,373	0,276

Erütromüsiini katses ilmnes, et tüvi, milles puudus RNAas I, RNAas II, RNAas R ja PNPaas, kuid oli olemas RNAas PH, oli antibiootikumile kõige tundlikum ning tema minimaalne inhibitoorne kontsentratsioon oli 1,25 mg/ml. Tundlik oli ka tüvi, milles puudusid kõik eelnevalt nimetatud ribonukleasid, sealhulgas ka RNAas PH. Selle tüve minimaalne inhibitoorne kontsentratsioon oli 2,5 mg/ml. Samuti oli tundlik tüvi, milles puudusid RNAas I, RNAas II, PNPaas ja RNAas PH ning selle tüve minimaalne inhibitoorne kontsentratsioon oli 5 mg/ml (tabel 1).

Klooramfenikoli katses oli 2 tundlikku tüve, ühel neist puudusid RNAas I, RNAas II ja RNAas R, teisel puudus lisaks eelnevalt nimetatud ribonukleasidele ka RNAas PH. Mõlema tüve minimaalseks inhibitoorseks kontsentratsiooniks oli 0,3125 mg/ml (tabel 2).

Rifampitsiin katses omas kõige ilmsemat efekti tüvi, milles puudusid RNAas I, RNAas II, RNAas R ja PNPaas, kuid on olemas RNAas PH. Antud katse piirides ei ole võimalik tuvastada selle tüve minimaalset inhibitoorset kontsentratsiooni (tabel 3).

Trimetoprimmi katses omas kõige suuremat efekti kaks tüve, milles puudub RNAas I, RNAas II, RNAas R, PNPaas, RNAas PH, ja tüvi, milles puudusid eelnevalt nimetatud ensüümid, kuid RNAas PH oli olemas. Mõlema tüve minimaalne inhibitoorne kontsentratsioon oli 0,000305 µg/ml (tabel 4).

2.6 Arutelu

Antud töös näitasime, et valgusünteesi inhibeerivate antibiootikumide toimet lagundati nii 16S rRNA-d kui ka 23S rRNA-d (joonis 7 ja 8). Teises katses soovisime uurida nende ribosoomide stabiilsust antibiootikumide juuresolekul, mis olid sünteesitud enne antibiootikumide lisamist. Nägime, et ribosoomid, mis olid sünteesitud enne antibiootikumide lisamist, püsisid stabiilsed 6 tunni vältel. Seega on tõenäoline, et lagundatakse neid ribosoomide, mis on sünteesitud pärast antibiootikumi lisamist. Need tulemused on kooskõlas teiste tulemustega meie laboris, mille kohaselt isegi mutatsiooniliselt destabiliseeritud ribosoomid on statsionaarses kasvufaasis stabiilsed (A. Paier, avaldamata andmed). Seega tundub, et sünteesi käigus kahjustatud ribosoomide ja valmis ribosoomide lagundamist võivad initsieerida erinevad endoribonukleaasid. Minimaalse inhibitoorse kontsentratsiooni määramise katses nägime, et tüved, millest on deleteeritud erinevad RNAaside kombinatsioonid, on tundlikud erinevatele antibiootikumidele. Paraku olid tüved, millest oli välja võetud rohkem ribonukleaase, tundlikud ka antibiootikumide suhtes, mis ei inhibeeri valgusünteesi (rifampitsiin ja trimetoprim). Mutantsed tüved, millest olid deleteeritud RNAas I, RNAas II, RNAas R, ning tüved, milles puudusid lisaks eelnevalt nimetatud ensüümidele ka PNPaas ja RNAas PH, olid tundlikud erütromütsiini ja klooramfenikoli suhtes. Samas esines ka tundlikus rifampitsiini ja trimetoprimi suhtes, mis ei ole valgusünteesi inhibiitorid. Seega ei saa me olla kindlad, et RNAas⁻ tüvede suurem tundlikkus valgusünteesi inhibeerivate antibiootikumide tõttu on spetsiifilises seoses antud RNAaside funktsiooniga ribosoomide lagundamisel. Alternatiivseks lahenduseks on võimalus, et tüved, milles puuduvad erinevad RNAasid, on üldiselt tundlikumad stressi suhtes. Seega jääb lahenduseta küsimus RNA degradatsiooni feneotüübilisest spetsiifilisest mõju raku kasvule.

KOKKUVÕTE

Käsoleva töö eesmärgiks on uurida, kas valgusünteesi inhibeerivate antibiootikumid põhjustavad ribosoomide lagundamist ning samas, kas antibiootikumide juuresolekul korrektselt assambleeritud ribosoomid stabiilsed. Samuti soovisime uurida antibiootikumide mõjul toimunud ribosoomide lagundamise fenotüüpilist mõju raku kasvule. Selleks me kasutasime esinevaid RNAas⁻ tüvesid, kust oli deleteeritud erinevad ribonukleaaside komplektid. Need RNAasid, mis olid deleteeritud, osalevad ribosoomide lagundamisel.

Antibiootikumide juuresolekul lagundatakse sünteesi käigus ribosome, samas kui juba kokkupakitud ribosome ei lagundata valgusünteesi inhibeerivate antibiootikumide juuresolekul.

Tulemused:

Northern bloti töös sooviti uurida, kas valgusünteesi inhibeerivate antibiootikumide mõjul toimub rakkudes ribosoomide lagundamine. Katse tulemused viitavad sellele, et ribosoomide lagundamine toimub nii metsiktüüpi tüves kui ka RNAas R⁻ mutantis tüves. Metsiktüüpi tüves eemaldati tekkinud fragmendid RNAas R poolt sedavõrd kiiresti, et neid ei olnud võimalik Northern blotiga tuvastada. RNAas R on 3'-5' suunaline eksoribonukleas, mis peetakse üheks põhiliseks rRNA lagundavaks ensüümiks.

Ribosoomide degradatsiooni uurimiseks kloneeriti arabinoosi poolt indutseeritav pBAD promootori kontrolli alla rRNA operon rrnB. 23S rRNA välja puhastamiseks kloneeriti konstrukti streptavidini siduv aptameer ja 16S rRNA jaoks MS2 RNA aptameer (joonis 9). Selle abil on võimalik eristada meid huvitavaid ribosome, mis on sünteesitud enne antibiootikumi lisamist teistest raku sünteesitud ribosoomidest. Radioaktiivsuse kaudu oli võimalik hinnata aptameere sisaldavate rRNA-de hulga muutust ajast. Kui radioaktiivsus oleks langenud, siis viitaks see nende rRNA-de lagundamisele. Antud katses ei nähtud radioaktiivsuse langust ning ribosoomid, mis sünteesiti enne antibiootikumi lisamist, osutusid 6 tunni vältel stabiilseteks.

Minimaalse inhibitoorse kontsentratsiooni uurimise katses soovisime uurida RNA degradatsiooni fenotüübilist mõju raku kasvule. Mutantsed tüved, milles puudusid RNAas I, RNAas II, RNAas R ning tüved, milles puudusid lisaks eelnevalt nimetatud ensüümidele ka PNPaas ja RNAas PH olid tundlikud erütromütsiini ja klooramfenikoli suhtes, aga ka rifampitsiini ja trimetoprimi suhtes. Seega ei saa me olla kindlad, et RNAas⁻ tüvede suurem

tundlikkus valgusünteesi inhibeerivate antibiootikumide tõttu on spetsiifilises seoses antud RNAaside funktsiooniga ribosoomide lagundamisel. Alternatiivseks lahenduseks on võimalus, et tüved, milles puuduvad erinevad RNAasid, on üldiselt tundlikumad stressi suhtes. Seega ei õnnestunud antud töö põhjal väita, et valgusünteesi inhibeerivatel antibiootikumidel oleks oluline funktsionaalne roll ribosoomide lagundamisel.

SUMMARY

Antibiotics, which inhibit protein synthesis, influence on ribosomes stability in *Escherichia coli*

Marin Sulomägi

Ribosome is a cytoplasmic organelle, which decodes mRNA into a protein. Ribosome consists of two subunits: 30S and 50S. These subunits are made of rRNA and ribosomal proteins. These components are synthesized stoichiometrically. The assembly of ribosomes is a complex process. In addition to the synthesis of the components, the ribosomal proteins have to be in the right conformation and modified as needed. The function of ribosome is to translate the genetic information from mRNA into a protein. Translation consists of three stages: initiation, elongation and termination. The first step is initiation. For this the 70S ribosome dissociates into its two subunits: 30S and 50S. Now the mRNA can associate with the small ribosomal subunit. For the next step, elongation, it is needed that the small and big subunits bind together. Elongation is the stepwise addition of amino acids to the growing protein chain. The addition of amino acid is repeated until the ribosome encounters a stop-codon. At this point the translation is terminated. rRNA, which can be found in ribosomes, and tRNA, which is needed in translation, are considered to be stable RNAs. Unlike mRNA, which is known as unstable RNA.

In certain conditions ribosomes can be degraded. The degradation of ribosomes is carried out by ribonucleases. Ribonuclease is a type of nuclease that catalyzes the degradation of RNA into smaller components. Ribonucleases can be divided into endoribonucleases and exoribonucleases. The breakdown of ribosomes and degradation of stable RNA under conditions of starvation, stationary phase, and slow growth can be of major importance to bacterial cells under natural conditions. Treatment of bacteria with any one of a variety of agents leads to extensive breakdown of cellular RNA. One of these agents can be antibiotics. In stress conditions rRNA is usually degraded and tRNA can stay stable under these conditions. Antibiotics are synthesized by microorganisms (fungi, bacteria) or made industrially. Ribosome, that carries out the translation, can be target for different agents including antibiotics (Deutscher, 2003).

The aim of this study was to find out if the antibiotics, which inhibit the synthesis of proteins, also have effects on ribosome degradation. In this study two antibiotics, erythromycin and chloramphenicol, were used. Chloramphenicol inhibits the formation of peptide bond (Harms *et al.*, 2003) and erythromycin inhibits protein synthesis by binding to the 23S rRNA molecule

(in the 50S subunit) of the bacterial ribosome blocking the exit of the growing peptide chain. It was found that the degradation of ribosomes took place in both strains (wild type and RNAse R⁻ mutant). Ribosomal assembly defects are usually more pronounced in lower growth temperatures, so we tested the effects of chloramphenicol and erythromycin at 25°C as well as in 37°C (Siibak *et al.*, 2009). In the mutant strain where exoribonuclease RNAse R was missing we found particles, which we did not find in wild type strain. This indicates that these particles were degraded by RNAse R in the wild type strain so fast that they could not be detected by Northern blot.

We also wanted to know what happens to ribosomes before the addition of antibiotics. We used the experimental, which was worked out by Siibak *et al.* They cloned an rRNA operon under repressible arabinose BAD (araBAD) promoter and added streptavidin-binding (Leonov *et al.*, 2003) and MS2 RNA aptamers (Youngman & Green, 2005) to 23S rRNA and 16S rRNA. The activity of this promoter was inhibited by glucose medium. In this experiment no reduction in radioactivity was observed indicating that ribosomes, which were synthesized before the addition of antibiotic, remained stable.

KIRJANDUSE LOETELU

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K.A., Tomita, M., Wanner, B.L. ja Mori, H. (2006) Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knock-out mutants – the Keio collection. *Mol Systems Biol*, doi:10.1038/msb4100050

Basturea, G. N., Zundel, M. A. ja Deutscher, M. P. (2011) Degradation of ribosomal RNA during starvation: Comparison to quality control during steady-state growth and a role for RNase PH. *RNA*. 17, 338-345

Bessarab, D. A., Kaberdin, V. R., Wei, C.-L., Liou, G.-G., Lin-Chao, S. (1998) RNA components of *Escherichia coli* degradosome: Evidence for rRNA decay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 3157-3161

Blattner, F.R., Plunkett, G. III, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C. K., Mayhew, G.F. *et al.* (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*. 277:1453-1462

Boni, I. V., Isaeva, D. M., Musychenko, M. L., and Tzareva, N. V. (1990). Ribosome-messenger recognition: mRNA target sites for ribosomal protein S1. *Nucleic Acids. Res.* 19, 155-162

Bremer, H. ja Dennis, P. P. (1987). Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. American Society for Microbiology. 1527-154

Cheng, Z. F. ja Deutscher, M. P. (2003) Quality control of ribosomal RNA mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100, 6388-6393

Condon, C., French, S., Squires, C., and Squires, C.L. (1993). Depletion of functional ribosomal RNA operons in *Escherichia coli* causes increased expression of the remaining intact copies. *EMBO J.* 12, 4305-4315.

Culver, G. M. (2003) Assembly of the 30S ribosomal subunit. *Biopolymers*. 68, 234-249

Datsenko, K.A. ja Wanner, B.L. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97, 6640-6645

- Datta, S., Costantino, N., Court D.L. (2006) A set of recombineering plasmids for gram-negative bacteria. *Gene*. 379, 109-115
- Deutscher, M. P. (2003) Degradation of stable rRNA in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*. 278, 45041-45044
- Deutscher, M. P. (2006) Degradation of RNA in bacteria: Comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Res.* 34, 659-666
- Deutscher, M. P. (2009) Maturation and degradation of ribosomal RNA in bacteria. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 85, 369-391
- Harms, J. M., Bartels, H., Schlünzen F. ja Yonath, A. (2003) Antibiotics acting on the translational machinery. *Journal of Cell Science*. 116, 1391-1393
- Held, W. A., Mizushima, S., Nomura, M. (1973). Reconstitution of *Escherichia coli* 30S ribosomal subunits from purified molecular components. *J. Biol. Chem.* 248, 5720-5730
- Herold, M. ja Nierhaus K. H. (1987) Incorporation of Six Additional Proteins to Complete the Assembly Map of the 50 S Subunit from *Escherichia coli* Ribosomes. *The J. of Biol. Chem.* 262, 8826-8833
- Hillebrand, A., Wurm, R., Menzel A. ja Wagner, R. (2005) The seven *E. coli* ribosomal RNA operon upstream regulatory regions differ in structure and transcription factor binding efficiencies. *Biol. Chem.* 386, 523-534
- Holmes, K. L. ja Culver. G. M. (2004) Mapping structural differences between 30S ribosomal subunit assembly intermediates. *Nat. Struct. & Mol. Biol.* 11, 179-186
- Kaczanowska, M., Rydén-Aulin, M. (2007) Ribosome Biogenesis and the Translation Process in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 477-494
- Kaplan, R., Apirion, D. (1975) The fate of ribosomes in *Escherichia coli* cells starved for a carbon source. *J. Biol. Chem.* 250, 1854-1863
- Kisselev, L. (2002) Polypeptide Release Factors in Prokaryotes and Eukaryotes: Same Function, Different Structure. *Structure*. 10, 8-9

- Kycia, J. H., Biou, V., Shu, F., Gerchman, S. E., Graziano, V. ja Ramakrishnan, V. (1995) Prokaryotic Translation Initiation Factor IF3 Is an Elongated Protein Consisting of Two Crystallizable Domains. *Biochemistry*. 34, 6183-6187
- Leonov, A. A., Sergiev, P. V., Bogdanov, A. A., Brimacombe, R. ja Dontsova, O. A. (2003) Affinity purification of ribosomes with a lethal G2655C mutation in 23 S rRNA that affects the translocation. *J. Biol. Chem.* 278, 25664-25670
- Maes, A., Gracia, C., Hajnsdorf, E., and R é gnier, P. (2011). Search for poly(A) polymerase targets in *E. coli* reveals its implication in surveillance of Glu tRNA processing and degradation of stable RNAs. *Mol. Microbiol.* 83, 436-451
- Maiväli, Ü., Paier, A. ja Tenson, T. (2013) When stable RNA becomes unstable: degradation of ribosomes in bacteria and beyond. *Biol. Chem. Ilmumas* (DOI 10.1515/hsz-2013-0133)
- Vincent, H. A. ja Deutscher, M. P. (2009) Insights into how RNase R degrades structured RNA: analysis of the nuclease domain. *J. Mol. Biol.* 387, 570-583
- Malys, N. Ja McCarthy, J. E. G. (2011) Translation initiation: variations in the mechanism can be anticipated. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 68, 991-1003
- Mattheakis, L., Vu, L., Sor, F., Nomura, M. (1989) Retroregulation of the synthesis of ribosomal proteins L14 and L24 by feedback repressor S8 in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 86, 448-452
- Moreno, J. M. P., Dyrskjøtersen, L., Kristensen, J. E., Mortensen, K. K. ja Sperling-Petersen, H. E. 1999. Characterization of the domains of *E. coli* initiation factor IF2 responsible for recognition of the ribosome. *FEBS letters*. 445, 130-134
- Paul, B. J., Ross, W., Gaal, T., Gourse, R. L. (2004) rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 38, 749-770
- Piir, K., Paier, A., Liiv, A., Tenson, T. ja Maiväli, Ü. (2011) Ribosome degradation on growing bacteria. *EMBO Rep.* 12, 458-462
- Ramakrishnan, V. (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell*. 108, 557-572
- Röhl, R. ja Nierhaus, K. H. (1982) Assembly map of the large subunit (50S) of *Escherichiacoli* ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 79, 729-733

- Schmeing, T. M. ja Ramakrishnan, V. (2009) What recent ribosome structures have revealed about the mechanism of translation. *Nature*. 461, 1234-1242
- Schneider, D. A., Ross, W., ja Gourse, R. L. (2003) Control of rRNA expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion*. 6, 151-156
- Shajani, Z., Sykes, M. T., Williamson, J. R. (2011) Assembly of bacterial ribosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 501-526
- Siibak, T., Peil, L., Dönhöfer, A., Tats, A., Remm, M., Wilson, D. N., Tenson, T. ja Remme, J. (2011) Antibiotic-induced ribosomal assembly defects result from changes in the synthesis of ribosomal proteins. *Mol. Microbiol.* 80, 54-67
- Siibak, T., Peil, L., Xiong, L., Mankin, A., Remme, J. ja Tenson, T. (2009) Erythromycin- and chloramphenicol-induced ribosomal assembly defects are secondary effects of protein synthesis inhibition. *Antimicrob Agents Chemother.* 53, 563-571
- Siibak, T. ja Remme, J. (2010) Subribosomal particle analysis reveals the stages of bacterial ribosome assembly at which rRNA nucleotides are modified. *RNA*. 16, 2023-2032
- Soupene, E., van Heeswijk, W.C., Plumbridge, J., Stewart, V., Bertenthal, D., Lee, H., Prasa, G., Paliy, O., Charernnoppakul, P. ja Kustu, S. (2003) Physiological studies of *Escherichia coli* strain MG1655: Growth defects and apparent cross-regulation of gene expression. *J Bacteriol.* 185, 5611-5626
- Stark, H., Rodnina, M.V., Rinke-Appel, J., Brimacombe, R., Wintermeyer, W. ja Heel, M. (1997) Visualization of elongation factor Tu on the *Escherichia coli* ribosome. *Nature*. 389, 403-406
- Zengel, J. M. ja Lindahl, L. (1990) *Escherichia coli* ribosomal protein L4 stimulates transcription termination at a specific site in the leader of the S10 operon independent of L4-mediated inhibition of translation. *J. Mol. Biol.* 213, 67-78
- Zengel, J. M. ja Lindahl, L. (1994) Diverse Mechanisms for Regulating Ribosomal Protein Synthesis in *Escherichia coli*. *Prog. Nucleic Res Mol Biol.* 47, 331-3370
- Zundel, M. A., Basturea, G. N., Deutscher, M. P. (2009) Initiation of ribosome degradation during starvation in *Escherichia coli*. *RNA*. 15, 977-983

Talkington, M. T. W., Siuzdak, G. ja Williamson, J. R. (2005) An assembly landscape for the 30S ribosomal subunit. *Nature*. 438, 628-632

Thomas, M. S., Bedwell, D. M. ja Nomura, M. (1987) Regulation of alpha operon gene expression in *Escherichia coli*. A novel form of translational coupling. *J. Mol. Biol.* 196, 333-345

Wagner, R. (2002) Regulation of Ribosomal RNA Synthesis in *E. coli*: Effects of the Global Regulator Guanosine Tetraphosphate (ppGpp). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4, 331-340

Williamson, J. R. (2008) Biophysical studies of bacterial ribosome assembly. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 18, 299-304

Williams, K. J. ja Piddock, L. J. V. (1998) Accumulation of rifampicin by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 42, 597-603

Yamamoto, T., Shimizu, Y., Ueda, T., Shiro, Y. (2010) Mg^{2+} dependence of 70 S ribosomal protein flexibility revealed by hydrogen/deuterium exchange and mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 258, 5646-5652

Yancey, S.D., Kushner, S.R. (1990) Isolation and characterization of a new temperature-sensitive polynucleotide phosphorylase mutation in *Escherichia coli* K-12. *Biochimie*. 72, 835-843

Youngman, E. M. ja Green, R. (2005) Affinity purification of *in vivo*-assembled ribosomes for *in vitro* biochemical analysis. *Methods*. 36: 305-312

Raamatud:

Moat, A. G., Foster, J. W. Ja Spector, M. P. (2002) *Microbial Physiology*, p. 53; 57; 69-72. Wiley-Liss, Inc.

Nierhaus, K. H. ja Wilson, D. N. (2004) Protein synthesis and ribosome structure. *Translating the genome*, p. 86-87; 145-146; 430-435; 438-444; 449; 451; 463. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M. ja Losick, R. (2004) *Molecular Biology of the Gene*, p. 433. CSHL PRESS.

LISA 1

10x MAB

1M maleiinhape (58 g)

1.5M NaCl (43,8 g)

400 ml mQ

pH viia 7.5, selleks kasutada NaOH lahust (lisada 37g kaupa 2-3 korda, selleks, et vältida ülekuumenemist, toatemperatuurini jahutada jääl). Sisestada pH elektrood ja vajadusel kohandada 2N NaOH-ga. Lõpuks lisata 500 ml mQ-d. Autoklaavida ja säilitada 4 °C juures. Enne kasutamist filtreerida läbi 0.2µm poorisuurusega filtri, et vähendada saastatust.

10x Blokeerimislahus

10% blokeerimisagent (Roche (Cat. No. 11 096 176 001)) lahustada 1x MAB-s. Soojendada + 65 °C, segada magnetsegajal, täielikuks lahustumiseks on vaja autoklaavida. Jaotada 10 ml kaupa laiali ja külmutada -20 °C juures.

10x MOPS puhver (1L)

200 mM MOPS (41,8 g)

pH viia 7.0, selleks kasutada 2N NaOH

50 mM naatriumatsetaat (20 ml 1M naatriumatsetaat pH 7.0)

20 mM EDTA (20 ml 0.5M pH 8.0)

Filtreerida läbi 0.2 µm filtri ja kaitsta valguse eest (säilitada toatemperatuuril).

20x SSC (2L)

3 M NaCl (350,6 g)

0.3 M naatriumtsitraat (176,4 g)

pH viia 7.0 , selleks kasutada HCl (20°C). Filtreerida läbi 0.2 µm poorisuurusega filtri ja autoklaavida (säilitada toatemperatuuril).

10 % SDS (500 ml)

Lisada 50 g SDS 400 ml mQ-le magnetsegajal (vältida sissehingamist, vajadusel kasutada maski). Täielikuks lahustumiseks kuumutada 65°C-ni. Filtreerida läbi 0.2-0.45 µm poorisuurusega filtri (säilitada toatemperatuuril).

0.5M EDTA pH 8.0 (500 ml)

Lisada 93,06 g EDTA 400 ml mQ-le. Lisada NaOH et pH viia 8.0. EDTA ei dissotsieeru täielikult enne, kui pH on 8 lähedal. Filtreerida läbi 0.2 µm poorisuurusega filtri ja autoklaavida (säilitada toatemperatuuril).

Pesu puhver 1 (1 L)

2x SSC (100 ml 20x SSC)

0.1% SDS (10 ml 10% SDS)

Pesu puhver 2 (1 L)

0.1x SSC (5 ml 20x SSC)

0.1% SDS (10 ml 10% SDS)

N-laurosüülsarkosiin alglahus

Lahustada 10% N-laurosüülsarkosiin (või naatriumi sool) vees. Filtreerida läbi membraani (0.2– 0.45 µm) (säilitada toatemperatuuril).

SDS hübridisatsiooni puhver

7% SDS

50% formamiid,

5x SSC

0.1% N-laurosüülsarkosiin

2% blokeerimislahus (1:5 lahjendus alglahusest (10%) blokeerimislahus)

50 mM naatriumfosfaat, pH 7.0

500 ml SDS hübridisatsiooni puhvri valmistamiseks on vaja teha järgnev lahus antud järjekorras:

- 250 ml 100% formamiidi
- 83 ml 30x SSC pH 7.0 (200 mleelnevalt valmistada: 52,7 g NaCl; 26,5 g trinaatriumtsitraat, pH kohandamiseks kasutada HCl)
- 25 ml 1 M naatriumfosfaat, pH 7.0 l
- 100 ml 10% blokeerimislahus
- 5 ml 10% N-laurosüülsarkosiin

Valada saadud lahus segamismõusse, mis sisaldab 35 g SDS. Kuumutada ja segada lahust seni, kuni SDS on lahustunud. Lahusele lisada vajalik kogus mQ-d, et saada 500 ml lahust. Säilitada toatemperatuuril, kuid enne kasutamist kuumutada 65°C-ni.

10X Detektsiooni puhver CDP-Stari reaktsiooni jaoks (250 ml)

30,25 g TRIS alus

29,2 g NaCl

mQ, et saadud lahuse kogus viia 200 milliliitrini

pH viia 9.5, kasutades selleks kontsentreeritud HCl, autoklaavida ja säilitada 4 °C juures.

Filtri mahavõtmise lahus (500 ml)

490 ml mQ vesi

5 ml EDTA (0.5M pH 8)

5 ml 10% SDS

1% SDS sisaldav TEN lahus

10mM Tris pH 7,5

1 mM EDTA

100mM NaCl

1% SDS

1x LLP

20 mM Tris pH 7,5

12 mM MgCl₂

60 mM KCl

60 mM NH₄Cl

LISA 2

CB

20 mM Tris pH 7,4

200 mM NaCl

1 mM EDTA

Sidumispuhver

20mM Tris-HCl pH 7.5

100mM NH₄Cl

10mM MgCl₂

Eluatsiooni puhver

20mM Tris-HCl pH 7.5

100mM NH₄Cl

10mM MgCl₂

10 mM Maltoos

1x LLP

20 mM Tris pH 7,5

12 mM MgCl₂

60 mM KCl

60 mM NH₄Cl

0,1% arabinoosi sisaldavat MOPS sööde

1× MOPS sool

1,32 mM K₂HPO₄

0,1% CAA (+4% trüptofaan)

0,2 µg/ml tiamiin

200 µg/ml amp

0,1% glükoosi sisaldavat MOPS sööde

1× MOPS sool

1,32 mM K₂HPO₄

0,1% CAA (+4% trüptofaan)

0,2 µg/ml tiamiin

200 µg/ml amp

Lihtlitsents

Mina, Marin Sulomägi

(sünnikuupäev: 03.05.1991)

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

Valgusünteesi inhibeerivate antibiootikumide mõju ribosoomide stabiilsusele soolekepikeses
Escherichia coli,

mille juhendaja on Ülo Maiväli,

reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 28.5.2013